



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“DIRECCIONAMIENTO DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE PROTEÍNAS DE VIRUS INFLUENZA A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO PARA LA GENERACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HETEROSUBTÍPICA”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
M. en C. HERBEY OSWALDO PADILLA QUIRARTE

TUTOR
DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA
Facultad de Medicina, UAEM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
Instituto de Biotecnología, UNAM

DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ
Facultad de Farmacia, UAEM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CRÉDITOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la tutoría del Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT), a través de una beca de doctorado (No. 375463).

El trabajo fue financiado por los apoyos gubernamentales de SEP-CONACYT (2015-01-257420) y SEP-PRODEP (Redes temáticas de colaboración de CA, 2015).

Este trabajo fue presentado en congresos nacionales e internacionales y se contó con apoyo económico del programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP-UNAM), de la red mexicana de virología (RMV) y de laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Esquivel, por permitirme realizar mi formación como doctor en ciencias dentro de su laboratorio. Le agradezco infinitamente todas sus enseñanzas y consejos sobre diseño experimental, organización de resultados y escritura de artículos. Muchas gracias Doc!

A la Dra. Vanessa López, por instruirme experimentalmente en las primeras etapas del proyecto, por su ayuda desinteresada y por siempre tener disposición para el proyecto. Muchas Gracias Vane!

Al Dr. Oscar Badillo, por ayudarme en las etapas finales del proyecto, por sus consejos experimentales y por su compañerismo.

A los miembros de mi comité tutorial Dr. Carlos Arias y Dr. José Luis Montiel, quienes enriquecieron mi trabajo con sus consejos y puntos de vista a lo largo de este proyecto.

A todos los compañeros con los que conviví en el laboratorio de inmunología viral, particularmente a aquellos con los que entablé una amistad. Gracias por todo Adriana, Cristian, Edgar, Sara, Yunuen, Daniel, Tepoz, Yuvi, Alicia y Alex.

A la Dra. Lourdes Gutierrez y a todo el laboratorio 5 planta baja del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública por recibirme tan cálidamente en su grupo después del sismo de septiembre del 2017.

A los miembros de mi Jurado: Dra. Yvonne Rosenstein, Dra. Angélica Santana, Dr. Gustavo Pedraza, Dr. Mario Cruz y Dr. Pavel Isa. Gracias por evaluar mi trabajo y por sus comentarios enriquecedores.

A mis amigos Alex Zurita, Elizabeth Meda, Flor García, Francisco Rodríguez, gracias por su apoyo incondicional.

Finalmente, gracias a mi familia, a mis hermanos Horacio y Karen, a mis sobrinos Camila, Regina, Rafa y Omar Alonso, y a mis padres Horacio y Cecilia por siempre estar presentes. Esto es para ustedes.

DEDICATORIA

Para mis padres Horacio y Cecilia

... per aspera ad astra ...

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Las siguientes siglas y abreviaturas proceden del idioma inglés (a menos que se indique lo contrario).

2-ME	β -mercaptoetanol
Ab	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADP	Fagocitosis dependiente de anticuerpos
AM	Macrófago alveolar
APC	Célula(s) presentadora(s) de antígeno
AS	Ácido siálico
BB	Buffer de unión
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CFSE	Carboxifluoresceína
CLR	Receptores de lectina tipo C
ConA	Concavalina A
CRD	Dominios de reconocimiento de carbohidratos
CTL	Linfocito T citotóxico
CTLD	Dominios parecidos a lectinas tipo C
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Célula(s) dendrítica(s)
DL ₅₀	Dosis letal media 50
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
dsRNA	RNA de doble cadena
EBNA	Antígeno nuclear del virus de Epstein Barr
FBS	Suero Fetal Bovino
ffu	Unidades formadoras de focos
GC	Centro germinal
HA	Hemaglutinina
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
HSI	Inmunidad heterosubtípica
IAV	Virus Influenza A
IFNAR	Receptor de interferón tipo I
IFNLR	Receptor de interferón tipo III
ISG	Genes de respuesta a interferón
ITRS	Infecciones del tracto respiratorio superior
LN	Nódulo linfoide
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
M2e	Ectodominio de la proteína M2
mAb	Anticuerpo monoclonal
MDCK	Células de riñón de perro Madin-Darby
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mx	Proteína de resistencia a mixovirus

NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de exporte nuclear (antes NS2)
NP	Nucleoproteína
OMS	Organización Mundial de la Salud (en español)
ON	Toda la noche
OVA	Ovalbúmina
PA	Polimerasa ácida
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
PBS	Buffer de fosfatos
pDC	Célula dendrítica plasmocitoide
pfu	Unidades formadoras de focos
Poly I:C	Ácido poliinosinico:policitidilico
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RNA	Ácido ribonucleico
snRNA	RNA nuclear pequeño
ssRNA	RNA de cadena sencilla
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidil 4-(N-maleidometil)ciclohexano-1-carboxilato
TA	Temperatura ambiente (en español)
Tfh	Célula T folicular
Th	Célula T cooperadora
TIV	Vacuna Trivalente de Influenza
TPCK	6-(1-tosilamida-2-fenil)etil clorometil cetona
Treg	Células T reguladoras Foxp3 ⁺
VLPs	Partículas pseudovirales
vRNA	RNA viral
vRNP	Complejo de ribonucleoproteína viral

RESUMEN

El virus influenza A (IAV) es un importante peligro para la salud mundial. Las vacunas anuales actuales ofrecen protección únicamente contra cepas homosubtípicas, y existe el continuo riesgo de que nuevas cepas surjan ocasionando pandemias, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación. En este sentido, una nueva estrategia para incrementar o modular la inmunidad es el direccionamiento de antígenos a DC a través de anticuerpos que reconocen receptores endocíticos localizados en su superficie. En este trabajo, epítomos altamente conservados de proteínas de IAV fueron direccionados a DC a través de un anticuerpo que reconoce al receptor endocítico DEC-205, con el objetivo de lograr protección heterosubtípica en un modelo de ratón. Grupos de ratones BALB/c fueron inoculados s.c. tres veces con el anticuerpo anti-DEC-205 conjugado químicamente con péptidos sintéticos derivados de epítomos de células T CD4⁺ y B altamente conservados de NP, M2 y HA de IAV (M2₁₋₂₄, M2e; HA₃₂₂₋₃₅₆; HAB, HA₉₆₋₁₀₄, HACD4, NP₁₈₂₋₂₀₅, NPCD4) en presencia de poly I:C como adyuvante. Previo a cada inmunización se colectó suero, y los niveles de anticuerpos se determinaron por ensayos de ELISA. Los ratones inmunizados se retaron i.n. con 30DL₅₀ de virus IAV H1N1/New Caledonia/20/99 o H3N2/NT/60/68 y la pérdida de peso y la sobrevida se monitorearon por 10 días. El direccionamiento a DEC-205 de M2e resultó en una protección heterosubtípica aumentada (cerca del 80% de sobrevida) que ratones tratados con cinco veces más péptido M2e libre. La respuesta de anticuerpos anti-M2e se incrementó después de la segunda inmunización, resultando en una respuesta predominante IgG1, la cual fue substancialmente mayor direccionando M2e a DEC-205, que en los grupos control. A pesar de que estos anticuerpos no fueron neutralizantes en células MDCK, ellos resultaron el principal mecanismo protector efector de la vacuna, lo que fue evidenciado por experimentos de transferencia pasiva de suero. Además, cuando DEC-205 fue direccionado con epítomos para células T CD4⁺, la mortalidad no cambió comparada con los grupos control, y el direccionamiento de HAB no tuvo efecto en la producción de anticuerpos o en la sobrevida. Estos resultados indican que el direccionamiento de M2e a DEC-205 es una plataforma efectiva de vacunación que pudiera ser considerada para aumentar la inmunogenicidad de este epítomo en una vacuna universal heterosubtípica contra IAV.

ABSTRACT

Influenza Virus (IAV) is an important threat to public health worldwide. Current annual vaccines offer protection only against homosubtypic strains and there is a continuous risk that new pandemic viruses emerge, thus it is necessary to develop new vaccination approaches. In this regard, a new strategy to increase or modulate immunity is targeting antigens to dendritic cells (DC) through antibodies which recognize endocytic receptors localized on their surface. In this work, highly conserved epitopes of influenza proteins were targeted to DC through an antibody that recognize the endocytic receptor DEC-205 with the aim of achieving heterosubtypic protection in a mice model. Groups of BALB/c mice were inoculated subcutaneously three times, four weeks apart with a specific antibody for DEC-205 chemically crosslinked with synthetic peptides derived of highly conserved epitopes of nucleoprotein, matrix protein 2 and hemagglutinin from IAV (*B epitopes*: M2₁₋₂₄, M2e, HA₃₂₂₋₃₅₆; *HAB, CD4 epitopes*: HA₉₆₋₁₀₄, HACD4, NP₁₈₂₋₂₀₅, NPCD4) in presence of poly I:C as adjuvant. Sera was collected before each immunization and antibody levels against each epitope were determined by ELISA assay. Immunized mice were challenged intranasally with 30DL₅₀ of mouse-adapted influenza virus H3N2/NT/60/68 or H1N1/New Caledonia/99, and weight loss and survival curves were constructed. Targeting of DEC-205 with M2e resulted in higher protection (about 80% of survival) than mice treated with 5-fold more peptide M2e alone. Anti-M2e antibodies were detected after second immunization and sera transfer experiments showed the protection was recovered when naïve mice were pretreated with immune sera anti-M2e. Despite these antibodies were not neutralizing in MDCK cells, they could be responsible of protection by cooperation for indirect mechanisms like phagocytosis, cellular cytotoxicity and complement activation. Furthermore, when DEC-205 was targeted with CD4 T cell epitopes, mortality do not change compared with control group, and targeting of HAB had no effect on antibody production and protection. These results indicate that targeting M2e to DEC-205 is an effective vaccination approach that could be used to augment its immunogenicity in an universal heterosubtypic vaccine against IAV.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla o Figura	Título	Página
Tabla 1	Estudios de vacunación con DEC-205	49
Tabla 2	Titulación de lisado pulmonar de virus influenza A adaptado a ratón	66
Tabla 3	Epítomos conservados de proteínas de virus influenza A	68
Figura 1	Diagrama de la estructura del virion de Virus Influenza A	16
Figura 2	Mecanismos de evolución de Virus Influenza A	18
Figura 3	Clasificación antigénica de Virus Influenza A	19
Figura 4	Ciclo de replicación de virus influenza A	25
Figura 5	Reconocimiento de virus influenza A por receptores de reconocimiento de patrones	28
Figura 6	Inmunidad humoral y celular al virus influenza A	33
Figura 7	Mecanismos de neutralización de anticuerpos contra virus influenza A	37
Figura 8	Lectinas tipo C en células dendríticas	45
Figura 9	Respuestas inmunes inducidas mediante el direccionamiento de antígeno hacia DEC-205	48
Figura 10	Determinación de DL ₅₀ para los lisados pulmonares infectados con virus influenza A	67
Figura 11	Detección de DEC-205 por anticuerpo purificado del hibridoma NLDC145	71
Figura 12	Entrecruzamiento bioquímico del anticuerpo α -DEC-205 con péptidos conservados de proteínas de virus influenza A	71
Figura 13	Esquema de inmunización de anticuerpos entrecruzados con péptidos derivados de epítomos conservados de proteínas de IAV	73
Figura 14	Cinética de anticuerpos anti-M2e y anti-HAB en ratones inmunizados	75
Figura 15	Sobrevida de ratones vacunados con anticuerpos conjugados con péptidos conservados de proteínas de virus influenza	76
Figura 16	Proliferación de células CTLL2 (dependientes de IL-2) con sobrenadantes de bazo de ratones inmunizados con anticuerpos conjugados	80
Figura 17	Proliferación de células de bazo procedentes de ratones inmunizados con anticuerpos conjugados y retados con dosis subletal de A/H3N2/NT/60/68	83
Figura 18	Proliferación de células de bazo procedentes de ratones inmunizados con anticuerpos conjugados y retados con dosis subletal de A/H3N2/NT/60/68 (2)	84
Figura 19	Caracterización de anticuerpos monoclonales conjugados con antígeno	87

Figura 20	Cuantificación de M2e unido al anticuerpo α -DEC-205 e isotipo	89
Figura 21	Los anticuerpos conjugados a antígeno mantienen su especificidad por DEC-205	90
Figura 22	Título de anticuerpos anti-M2e en ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e	92
Figura 23	El direccionamiento de M2e a DEC-205 aumenta la protección heterosubtípica en contra de Virus Influenza A	93
Figura 24	Diferentes vías de inmunización con α -DEC-205:M2e inducen protección	95
Figura 25	La transferencia adoptiva de suero anti-M2e induce protección en contra de la infección por IAV	97
Figura 26	Los anticuerpos anti-M2e generados ante la inmunización con α -DEC-205:M2e no son neutralizantes in vitro	98
Figura 27	Las células T CD4 ⁺ efectoras no son responsables de la protección inducida por α -DEC-205:M2e	100
Figura 28	En ratones C57BL/6 el direccionamiento hacia DEC-205 no induce protección	101
Figura 29	Modelo hipotético propuesto	110

ÍNDICE

CRÉDITOS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
SIGLAS Y ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	14
Virus Influenza A	14
Generalidades	14
Virus Influenza A	15
Ciclo de replicación	20
Respuesta inmune contra el virus influenza	24
Inmunidad Innata	24
Inmunidad Adaptativa	32
Vacunas contra Influenza	38
Estrategia actual	38
Candidatos para el desarrollo de una vacuna universal heterosubtípica	39
Direccionamiento de antígeno a células dendríticas	43
Receptores de lectina tipo C	44
JUSTIFICACIÓN	51
HIPÓTESIS	54
OBJETIVO	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS	55
Materiales	55

Animales de laboratorio	55
Células.....	55
Virus	56
Péptidos.....	56
Anticuerpos.....	56
Métodos.....	57
Titulación de Virus.....	57
Entrecruzamiento químico de anticuerpos monoclonales con péptidos u OVA	58
SDS-PAGE y Western blot.....	58
Slot-blot	59
Inmunización y Reto.....	60
Eliminación de células T CD4 ⁺	60
Transferencia pasiva de suero	60
Detección de anticuerpos séricos específicos de M2e o HAB.....	61
Ensayo de neutralización de IAV	61
Ensayo de proliferación de células CTLL2 (dependientes de IL-2) con sobrenadantes de células de bazo de ratones inmunizados	62
Proliferación de células de bazo de ratones inmunizados estimuladas con los epitopos por medio de la tinción con CFSE.....	63
Citometría de flujo	63
Análisis Estadístico	64
RESULTADOS	65
Desarrollo de un modelo murino de infección por Virus Influenza A.....	65
Epítopos conservados de proteínas de Virus Influenza A blancos de anticuerpos y células T CD4⁺	66
Producción de anticuerpos α-DEC-205 entrecruzados bioquímicamente con epitopos conservados de proteínas de virus influenza.....	69
Purificación del anticuerpo α -DEC-205.....	69

Entrecruzamiento del anticuerpo α -DEC-205 con péptidos derivados de epitopos conservados de proteínas de Virus Influenza	70
Inmunogenicidad de los anticuerpos conjugados (prueba de concepto)	72
Análisis de respuesta de anticuerpos.....	74
Evaluación de protección ante el reto con IAV.....	74
Estimulación antígeno específica en células de bazo de ratones vacunados.....	78
Conclusiones de la prueba de concepto	85
Direccionamiento de M2e hacia DEC-205	85
Caracterización de anticuerpos entrecruzados con antígeno	85
El direccionamiento de M2e hacia DEC-205 generó una mejor respuesta inmune comparada con péptido libre M2e	91
Diferentes rutas de administración de α -DEC-205:M2e inducen altos niveles de protección.....	94
Los anticuerpos séricos anti-M2e inducidos por el direccionamiento a DEC-205, pero no las células T CD4 ⁺ efectoras, son los responsables de la protección.....	96
El direccionamiento de M2e a DEC-205 no es efectivo en ratones C57BL/6	99
DISCUSIÓN	102
Direccionamiento de HAB, HACD4 y NPCD4 a DEC-205	103
Direccionamiento de M2e a DEC-205	104
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	111
ANEXOS	112
Anexo A. Artículo de investigación original publicado	112
Anexo B. Artículo de revisión publicado	122
BIBLIOGRAFÍA	135

INTRODUCCIÓN

Virus Influenza A

Generalidades

La influenza es una enfermedad viral respiratoria aguda causada por el virus influenza A (IAV, por sus siglas en inglés). La infección se transmite de persona a persona, principalmente por medio de aerosoles que contienen al virus, el cual infecta a células superficiales del epitelio respiratorio. Esta enfermedad ocurre globalmente con una tasa anual de 5-10% en adultos, y 20-30% en niños, y puede ser causa de hospitalización y muerte, principalmente en grupos de riesgo (infantes, adultos mayores, enfermos crónicos) (1). Anualmente, estas epidemias anuales provocan un estimado de 3 a 5 millones de casos de enfermedad severa, y hasta medio millón de muertes (2).

Después de uno o dos días de infección por el virus influenza A, la enfermedad se manifiesta con síndromes respiratorios como tos seca, faringitis y congestión nasal, similares a los provocados por otras infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS). Adicionalmente se presentan síntomas sistémicos como fiebre (de más de 38°C), escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, letargia y anorexia, los cuales no aparecen en otras ITRS. En influenza típica no complicada, estos síntomas se resuelven aproximadamente en una semana. Sin embargo, en algunos pacientes, la infección progresa al tracto respiratorio inferior y se desarrollan complicaciones pulmonares como neumonía viral primaria y/o neumonía secundaria bacteriana (3).

En pacientes inmunocompetentes, la influenza epidémica (o estacional) no se complica en la mayoría de los casos y se mantiene confinada al tracto respiratorio superior. En algunas personas en riesgo como mujeres embarazadas o en periodo postparto, adultos mayores, personas con afección

cardiovascular o enfermedad pulmonar, la infección puede progresar a neumonía. Por su parte, las pandemias ocasionadas por virus influenza, aunque son infrecuentes, resultan en una morbilidad y mortalidad más alta que las causadas por las epidemias (3).

Virus Influenza A

Los virus influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, son envueltos y constan de un genoma de ocho segmentos de RNA, los cuales codifican para al menos 11 proteínas (**Figura 1**). Las diferencias antigénicas en la nucleoproteína (NP) y proteína de la matriz (M1) permiten su clasificación en los tipos A, B, C. La secuenciación ha confirmado que estos virus comparten un ancestro común; sin embargo han divergido genéticamente. De los tres tipos de virus influenza, los tipos A y B tienen mayor similitud en organización del genoma y homología de proteínas entre sí que los virus tipo C, lo que sugiere que éstos últimos divergieron antes que ocurriera la separación entre los virus A y B. Los virus tipo A se encuentran en aves, humanos, caballos y otras especies, mientras que los tipos B y C, infectan humanos y cerdos (4). Recientemente se describió el aislamiento de un nuevo virus influenza (tipo D) en cerdos, que es parecido a los virus influenza C (5). Sin embargo, debido a la importancia clínica y a las características del presente proyecto solo se discutirán aquí las peculiaridades de los virus influenza tipo A.

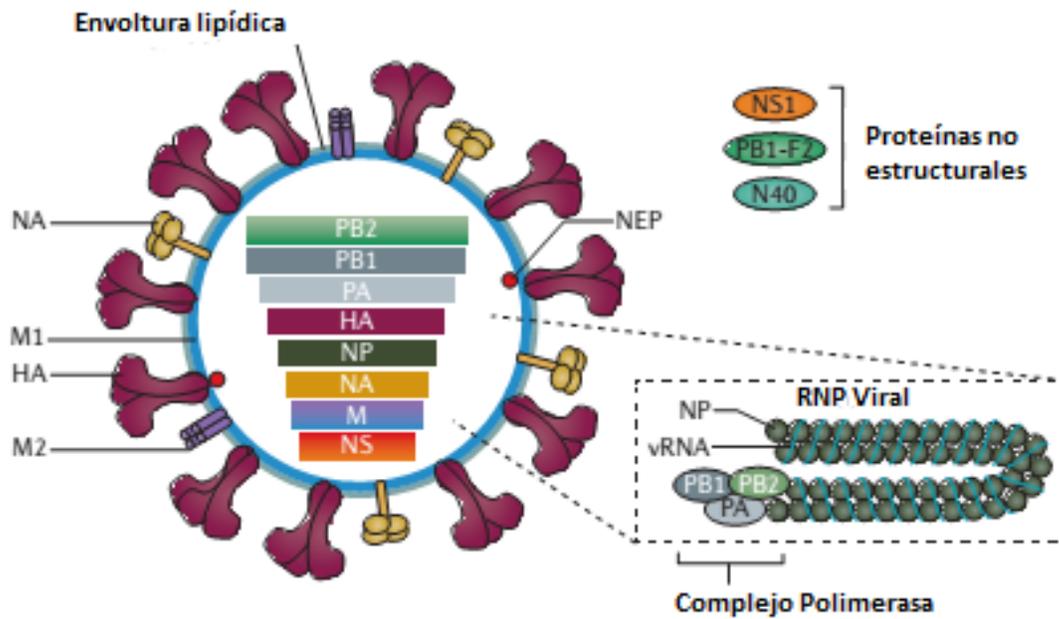


Figura 1. Diagrama de la estructura del virión de Virus Influenza A. Las dos glicoproteínas HA y NA, y la proteína M2 se encuentran incrustadas en la membrana viral, la cual proviene de la célula hospedera. El complejo ribonucleoproteína viral (vRNP) comprende a cada segmento de RNA viral (vRNA) asociado con la NP y las tres proteínas polimerasa (PA, PB1 y PB2). La proteína M1 se asocia con cada vRNP y la membrana viral. La proteína de exporte nuclear también está presente en el virión en pequeñas cantidades. Las proteínas no estructurales NS1, PB1-F2, N40 y otras que han sido descritas no se encuentran en el virión, pero son producidas en algún punto del ciclo de replicación. Modificado de Medina y García Sastré, 2011(6).

Existen dos mecanismos de evolución de IAV: el *drift antigénico* (deriva génica) y el *antigénic shift* (reordenamiento génico). El *drift antigénico* ocurre frecuentemente debido a la pobre fidelidad de la polimerasa viral que genera mutaciones puntuales en la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las cuales permiten que los virus escapen de los anticuerpos neutralizantes y eventualmente, estas mutaciones son introducidas en las cepas circulantes. Este mecanismo hace necesaria la revisión anual de las vacunas de IAV estacionales. Por otro lado, el *shift antigénico*, consiste en la generación de una cepa completamente nueva por el reordenamiento de segmentos génicos durante coinfecciones con virus de humano, aves y/o cerdos(7). Este cambio evolutivo es responsable del surgimiento de las cepas pandémicas, como es el caso del virus H1N1 que surgió en el año 2009 en Norteamérica, el cual corresponde al rearrreglo de segmentos génicos de virus porcino, aviar y humano **(Figura 2)**.

Los virus influenza A se subclasifican con base en la antigenicidad de la HA y NA. Actualmente, se han identificado 18 HA (H1-H18) y 11 NA (N1-N11) (8), las cuales son preservadas mayormente en virus que infectan aves acuáticas, especialmente en patos **(Figura 3)**. La HA tiene una función importante en determinar el tropismo del huésped, de manera que se une a los receptores celulares que contienen ácido sialico (AS, ácido N-acetilneuramínico), unido en conformaciones α -2-3 ó α -2-6, además contiene un sitio de corte que debe ser escindido por proteasas del huésped. La secuencia de aminoácidos de este sitio de corte modula el tropismo del tejido y la liberación sistémica, afectando la severidad de la enfermedad. La NA, por su parte, destruye los receptores que contienen AS del huésped y de las membranas virales, un proceso que es necesario para la liberación de la progenie viral en la superficie de la célula (9, 10).

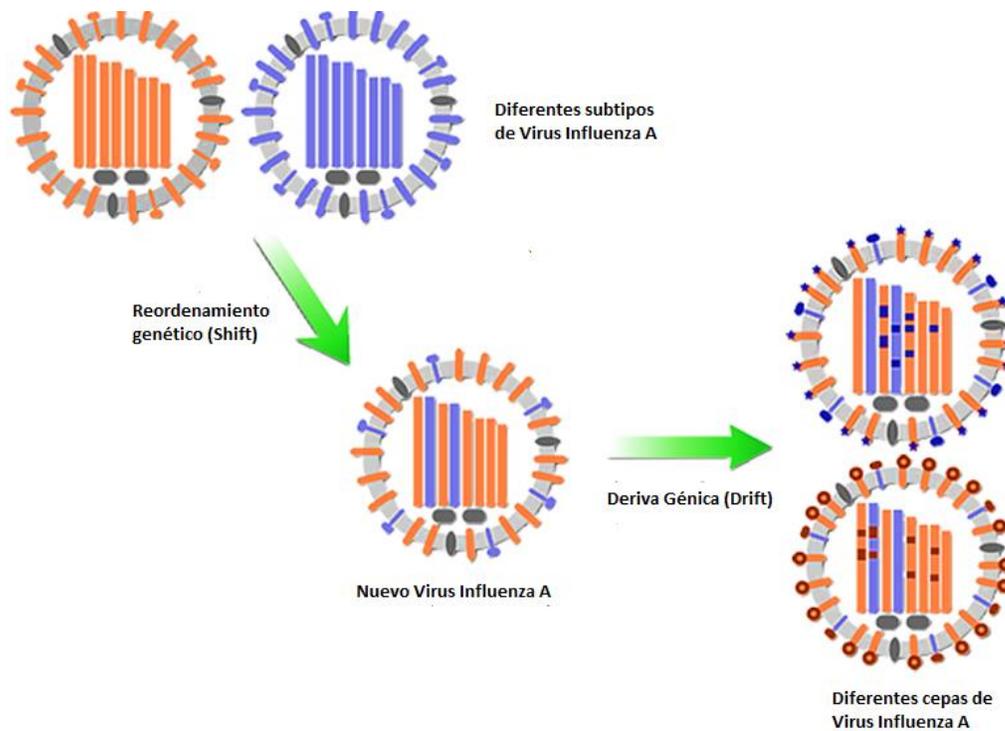


Figura 2. Mecanismos de evolución de Virus Influenza A. Los virus influenza experimentan un proceso de evolución mediado por dos mecanismos, los cuales explican la aparición de nuevas cepas epidémicas y pandémicas. El shift antigénico explica el surgimiento de cepas pandémicas y consiste en la aparición de un nuevo virus que surge de la coinfección de dos o más subtipos virales, dando lugar a una nueva cepa que contiene segmentos genéticos de ambos virus. El drift antigénico consiste en la mutación aleatoria que ocurre en los sitios antigénicos, de unión a anticuerpos, de las glicoproteínas de membrana, la HA y la NA, esto da lugar a nuevas cepas epidémicas y es responsable de la reformulación de la vacuna cada año. Modificado de CDC, 2014. (<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>; último acceso: Enero 2015).

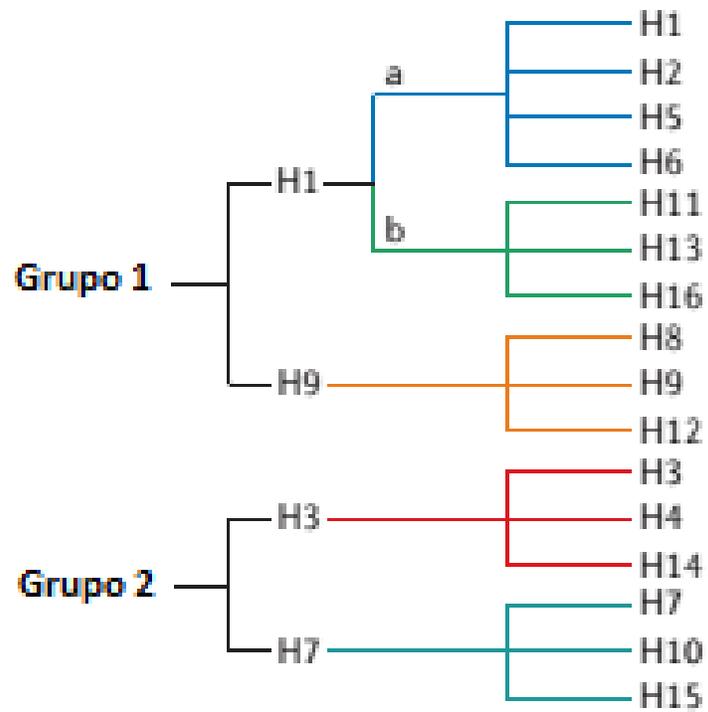


Figura 3. Clasificación antigénica de Virus Influenza A. Las propiedades antigénicas de la HA permiten la clasificación de los Virus Influenza A en dos grupos, 1 y 2, los cuales se subclasifican en cinco clados y 18 subtipos (La imagen solo incluye 16 subtipos). Modificado de Medina y García Sastré, 2011(6).

Los IAV tienen forma esférica o filamentosa de 100 a 300 nm de longitud. El virión está recubierto de espículas de HA y NA, en una relación de cuatro a uno, proyectándose desde una membrana lipídica derivada de la célula huésped. Un número pequeño de canales iónicos de la proteína de matriz 2 (M2) atraviesan la envoltura lipídica, con una relación M2:HA en el orden de una M2 por 10^1 - 10^2 moléculas de HA (11). La envoltura se encuentra sobrepuesta en una capa de proteína de matriz M1, la cual encierra el núcleo del virión, donde se encuentra la proteína de exporte nuclear (NEP; también llamada proteína no estructural 2, NS2) y el complejo de ribonucleoproteína (vRNP), el cual consiste de los segmentos de RNA virales recubiertos con NP y la polimerasa de RNA dependiente de RNA compuesta de dos polimerasas básicas y una polimerasa ácida (PB1, PB2 y PA) (12).

Los ocho fragmentos de RNA de IAV se numeran en orden decreciente de longitud: los segmentos 1, 3, 4, 5 y 6 codifican solamente una proteína por segmento (PB2, PA, HA, NP y NA), mientras que el fragmento 2 codifica para PB1 y PB1-F2; el 7 para M1 y M2; y por último, el 8 para NS1 y NEP/NS2. Los extremos de cada segmento viral de RNA forman una horquilla helicoidal, la cual está unida por el complejo heterotrimérico de la polimerasa. El segmento residual está cubierto con NP rica en arginina, la cual le proporciona una carga neta positiva, que se une a la carga negativa de los fosfatos del RNA viral (vRNA) (13).

Ciclo de replicación

El virus influenza se une a la célula huésped por medio de la interacción de la hemaglutinina con residuos de AS de glicoproteínas de la superficie de múltiples tipos celulares. El carbono-2 del AS puede unirse a los carbonos 3 o 6 de la galactosa, formando enlaces α -2-3 ó α -2-6, lo que resulta en configuraciones estéricas diferentes. Los virus que infectan aves preferencialmente se internalizan uniéndose a receptores α -2-3 presentes en células del epitelio intestinal; mientras que los virus que

infectan humanos, infectan mayormente a células del tracto respiratorio superior, que contienen receptores α -2-6(14).

La hemaglutinina de influenza es la proteína clave para la entrada del virus a la célula. Es una glicoproteína de membrana tipo I de aproximadamente 550 aminoácidos que forma homotrómeros en la membrana lipídica viral. Consta de una secuencia señal N-terminal, un dominio transmembrana cerca del extremo C-terminal y una cola citoplasmática corta. Inicialmente, se sintetiza como un polipéptido precursor (HA0) de 76 kDa usando la maquinaria de transcripción viral y la de traducción de la célula hospedera. El precursor de hemaglutinina HA0 consta de dos subunidades unidas: la HA1, que contiene el dominio de unión al receptor, y la HA2, la cual contiene el péptido de fusión. La molécula HA1 se encuentra principalmente en exterior del trímero de HA. Los primeros 18 aminoácidos forman parte de una hoja β plegada que se origina de aminoácidos en las regiones N- y C-terminal de la molécula de HA2. Este motivo es la estructura en la cual HA1 se une a la HA2 unida a membrana. Los siguientes 18 aminoácidos forman parte del surco que contiene el péptido de fusión hidrofóbico. El rompimiento de HA0 por medio de proteasas celulares y el cambio de pH en el endosoma permiten exponer al péptido de fusión en el extremo N terminal de HA2. El dominio de unión al ligando se encuentra en la zona superior de la espícula trimérica, y está compuesta de dos hojas β plegadas en forma de barril(14).

Después de la unión a AS, el virus se internaliza por medio de vesículas rodeadas de clatrina. En este proceso participan proteínas celulares como dinamina, una GTPasa que facilita la formación de las vesículas. Además, la epsina 1 participa en la formación de los endosomas. Ésta proteína adaptadora interactúa con proteínas como clatrina, AP-2 y Eps15, induciendo la curvatura de la membrana. Adicionalmente, se ha observado que el virus influenza puede ser endocitado por mecanismos independientes de clatrina, aunque esta última parece ser la principal ruta de entrada (15, 16).

El tráfico de partículas virales al núcleo consta de diferentes fases: en la etapa I, las vesículas endocíticas son transportadas por un proceso dependiente de actina dentro del citoplasma hasta convertirse en un endosoma temprano. En la etapa II, los endosomas tempranos son transportados mediante microtubulos dirigidos por dineína hacia la región perinuclear. En esta localización, comienza la primera acidificación y la maduración del mismo (pH 6.0). El movimiento continúa a través de microtúbulos en la etapa tres, y se acidifica aún más el endosoma (pH 5.0). Esto conduce a la liberación de los vRNPs, que se transportan al núcleo de la célula (17).

Una vez dentro del endosoma, el pH bajo (5-6 aprox) provoca un cambio conformacional que expone el péptido de fusión que se encuentra en HA2, el cual se inserta en la membrana endosomal, y por lo tanto, permite la fusión entre las membranas viral y endosomal. El pH bajo dentro del virus provocado por la internalización de protones al virión mediante el canal iónico M2 induce la desestabilización de las uniones entre la proteína de matriz M1 y los vRNPs. Una vez liberados del endosoma, los vRNPs se dirigen al núcleo por medio de transporte activo mediante señales de localización nuclear presentes en los ocho fragmentos ribonucleoproteicos. Una vez en el núcleo, son transcritos a RNA mensajero y RNA complementario antigenómico (18).

El proceso de replicación del genoma no requiere un iniciador, ya que la polimerasa viral inicia la síntesis internamente usando como templado el RNA antigenómico. En el caso de la transcripción de RNAs mensajeros virales, la polimerasa viral (que consiste de las proteínas PB1, PB2 y PA) se asocia con el dominio carboxilo terminal de Pol II celular, y particularmente PB2 se une a 7-metilguanosina (cap) de los pre-mRNAs del huésped, seguido de un corte endonucleolítico que cataliza PA. Esto resulta en un fragmento de RNA más 7-metilguanosina que es usado como primer por la subunidad PB1 para iniciar la transcripción del RNA viral (cap-snatching).

Se propone que la asociación directa entre la RNA polimerasa viral con la polimerasa II del huésped puede ser requerida para que la polimerasa viral acceda a los pre-mRNA-cap para su posterior corte endonucleolítico. Después de esto, el mRNA viral es poliadenilado por la polimerasa viral en el extremo 5' del templado de vRNA y los RNAs mensajeros virales son exportados al citoplasma para ser traducidos y producir las proteínas del virus en los ribosomas de la célula (19, 20).

Las proteínas virales deben volver al núcleo para ensamblarse con los RNAs virales para formar las vRNPs y posteriormente salir al citosol para continuar con el proceso de la formación de nuevos viriones. La proteína M1 contiene una señal de localización nuclear que dirige el transporte hacia el núcleo, además junto con la SUMOilación de M1 le permiten unirse a RNP recién sintetizadas a través de interacciones con la NP y con RNA. La proteína de exporte nuclear o NEP de 14 kDa puede atravesar directamente el poro nuclear sin unirse a importinas, y una vez dentro del núcleo se une a M1; NEP contiene dos secuencias de exporte nuclear, ambas reconocidas por Crm1, la cual se asocia a Ran-GTP. Estas asociaciones le permiten exportar las ribonucleoproteínas recién sintetizadas hacia el citoplasma (21-23).

Una vez que las vRNPs han sido exportadas del núcleo, deben formarse partículas virales y salir de la célula para comenzar de nuevo el ciclo replicativo en otra célula. Debido a que influenza es un virus envuelto, usa la membrana plasmática de la célula hospedera para formar las partículas virales. El ensamblaje y la liberación de viriones es un proceso complejo que ocurre en balsas lipídicas en la membrana apical de las células infectadas. Las proteínas virales hemaglutinina y neuraminidasa son reclutadas en balsas lipídicas presentes en la membrana celular, donde se asocian por medio de sus tallos citoplasmáticos con la proteína M1, que se comienza a polimerizar y formar la estructura interna del virion. Estas asociaciones proteicas permiten la alteración de la curvatura de la membrana. La escisión de la membrana parece ser estar relacionada con la proteína M2. La liberación de viriones

fuera de la célula es mediada por la proteína NA, la cual rompe los enlaces HA-ácido siálico generados durante el proceso de salida (24) (**Figura 4**).

Respuesta inmune contra el virus influenza

Inmunidad Innata

La infección por virus influenza en humanos inicia en el tracto respiratorio, y en la mayoría de los casos es contenida dentro de este órgano por la acción de mecanismos innatos de la respuesta inmune. Las células epiteliales, células dendríticas y macrófagos alveolares detectan patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) que interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) presentes en el virus, iniciándose cascadas de señalización que resultan en la producción de citocinas y quimiocinas, lo que provoca un estado antiviral localizado y reclutan al sitio de la infección otras células que intervienen en la eliminación del virus.

Reconocimiento de virus influenza por receptores de reconocimiento de patógenos

Las células epiteliales expresan constitutivamente TLR3, el cual reconoce RNA de doble cadena (dsRNA) en endosomas. Sin embargo, estas estructuras no son producidas durante una infección por virus influenza en niveles detectables. Se propone que TLR3 es activado por estructuras de RNA provenientes de células infectadas por IAV muertas que son fagocitadas, pero que aún no han sido caracterizadas. La activación de TLR3 induce a la producción de citocinas pro-inflamatorias las cuales pueden aumentar la patología; ratones *tlr3*^{-/-} sobreviven más tiempo a un reto letal de IAV, que ratones *wt*, sin embargo los niveles de quimiocinas y de infiltración de células T están reducidos(25, 26).

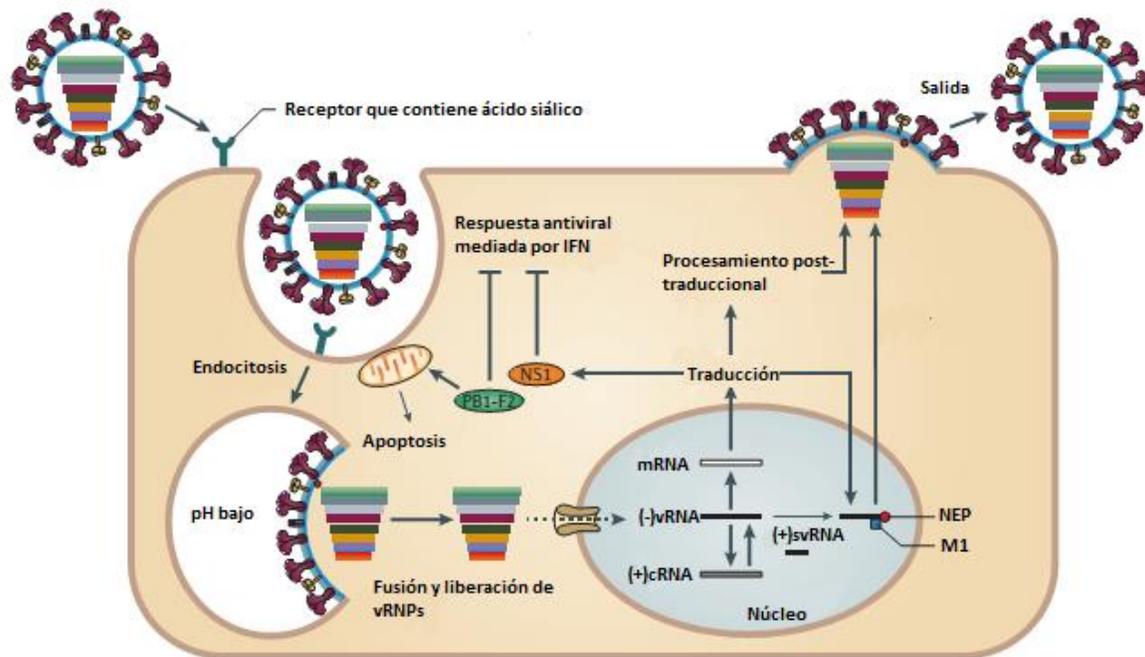


Figura 4. Ciclo de replicación de Virus Influenza A. La etapa inicial del ciclo de replicación de Virus Influenza A es la adhesión del virión a la célula hospedera. Para esto, la HA se une a receptores en la membrana celular que contienen ácido siálico. El virus entra a la célula por medio de endocitosis mediada por receptor. La acidificación del endosoma permite por un lado cambios conformacionales en HA, que permiten exponer al péptido de fusión, y por otro lado permite que el canal iónico M2 introduzca protones al virión acidificándolo y causando la disociación de los vRNPs de M1 para su consecuente liberación al citoplasma, luego de la fusión de las membranas viral y endosomal, para después trasladarse al núcleo. Una vez dentro del núcleo, la RNA polimerasa dependiente de RNA transcribe y replica el genoma, dando lugar a tres tipos de moléculas de RNA: el RNA complementario positivo (cRNA), el cual se usa como templado para generar más moléculas de vRNA; el RNA viral pequeño de sentido negativo (svRNA), el cual regula el switch de transcripción a replicación; y los mRNA, los cuales son exportados al citoplasma para su traducción. Las proteínas virales que son necesarias en replicación y transcripción son introducidas nuevamente al núcleo, y los RNPs de la progenie se exportan al citoplasma para su empaquetamiento, asistido por M1 y NEP. HA, NA y M2 son transportados vía *trans*-Golgi para llegar a la membrana plasmática donde se forman las partículas virales. Este proceso es asistido por M1. El proceso de salida está mediado por la actividad de NA, la cual destruye el ácido siálico. Modificado de Medina y García Sastré, 2011(6).

En células dendríticas plasmocitoides, TLR7 reconoce RNA de cadena sencilla (ssRNA), presente en el genoma de viriones de IAV internalizados en endosomas, por lo que este reconocimiento no requiere de replicación viral. La activación de TLR7 lleva a la activación de NF- κ B o IRF7, factores de transcripción responsables promover la transcripción de citocinas pro-inflamatorias e interferones tipo I. Además, TLR7 parece ser importante en la adecuada instrucción de células B para la generación de respuestas potentes de anticuerpos, pero no de células T. Por otro lado, dentro del citosol, RIG-I reconoce ssRNA de IAV que contienen 5'-trifosfato, lo que conlleva a la unión de ATP al dominio helicasa de RIG-I y al posterior reclutamiento de la proteína MAVS que señala a través de NF- κ B y culmina con la producción de interferones tipo I (26).

Interferones y genes de respuesta a interferón (ISG)

Los interferones tipo I (IFN- α/β) son citocinas que al unirse a su receptor (IFNAR) inducen la transcripción de ISG, los cuales al traducirse en proteínas promueven un estado antiviral en la infección por IAV, tanto en células infectadas como no infectadas. Dentro de estas proteínas antivirales se encuentran las de la familia de proteínas de resistencia a mixovirus (Mx), Mx1 en ratón y MxA en humano, las cuales tienen efectos negativos sobre la transcripción de RNA viral y su replicación; La proteína IFITM es otro ISG que actúa inhibiendo la fusión de las membranas celular y viral y por ende su replicación; OAS y RNAsa L actúan en concierto para degradar RNA celular y viral en células infectadas; PKR es una cinasa de serina/treonina que fosforila al factor iniciador de la traducción EIF2 α , inhibiendo la síntesis de proteínas, y ISG15, es una ubiquitina que promueve la degradación de proteínas virales recién sintetizadas (26).

Además de los interferones tipo I, el IFN- λ (IFN tipo III) es una citocina secretada mayormente por células epiteliales alveolares en respuesta a la infección por virus influenza. De hecho, es el IFN que predomina en esta infección. Los IFN tipo III, a pesar de tener el 10-15% de identidad con los de tipo

I, fueron catalogados así debido a que su inducción, señalización y actividades biológicas son similares. Sin embargo, la expresión de su receptor (IFNLR) está restringida a células epiteliales y hepatocitos.

Activación de inflammasoma NLRP3

Los inflammasomas son complejos multiproteicos que actúan como plataforma para la activación de caspasa-1, la cual rompe las formas inmaduras de IL-1 β e IL-18, resultando en su secreción al espacio extracelular. En respuesta a la infección por IAV, se ha reportado que existe un aumento de estas dos citocinas por macrófagos y células dendríticas derivadas de médula ósea en lavado bronqueoalveolar, mientras que ratones deficientes en el inflammasoma NLRP3 y caspasa-1, su liberación está comprometida, lo que sugiere que la infección por IAV promueve su liberación (27).

Los inflammasomas requieren dos señales para activarse: la señal 1 que proviene de la activación de la transcripción y traducción de genes que codifican para estas dos citocinas y la del propio inflammasoma; y la señal 2 proviene de estrés celular asociado a moléculas propias y/o no propias (DAMPs, patrones moleculares asociados a daño, por sus siglas en inglés). Para la activación del inflammasoma NLRP3 la primera señal es mediada por TLR, receptor de IL-1 y receptor de TNF, y es mantenida en gran medida por PAMP de bacterias comensales en condiciones normales, y aumentada por PAMP asociados a IAV después de la infección, mientras que la segunda señal está relacionada con estímulos propios de IAV como RNA de cadena sencilla, el flujo iónico a través del canal M2, y agregados de la proteína PB1-F2 en lisosomas(26). Se ha demostrado que en la infección por IAV la activación de NLRP3 es importante en el reclutamiento de células inmunes innatas como neutrófilos y monocitos debido a la inducción de quimiocinas como KC e MIP2 α , así como en la reparación de tejidos dañados por la infección (26) **(Figura 5)**.

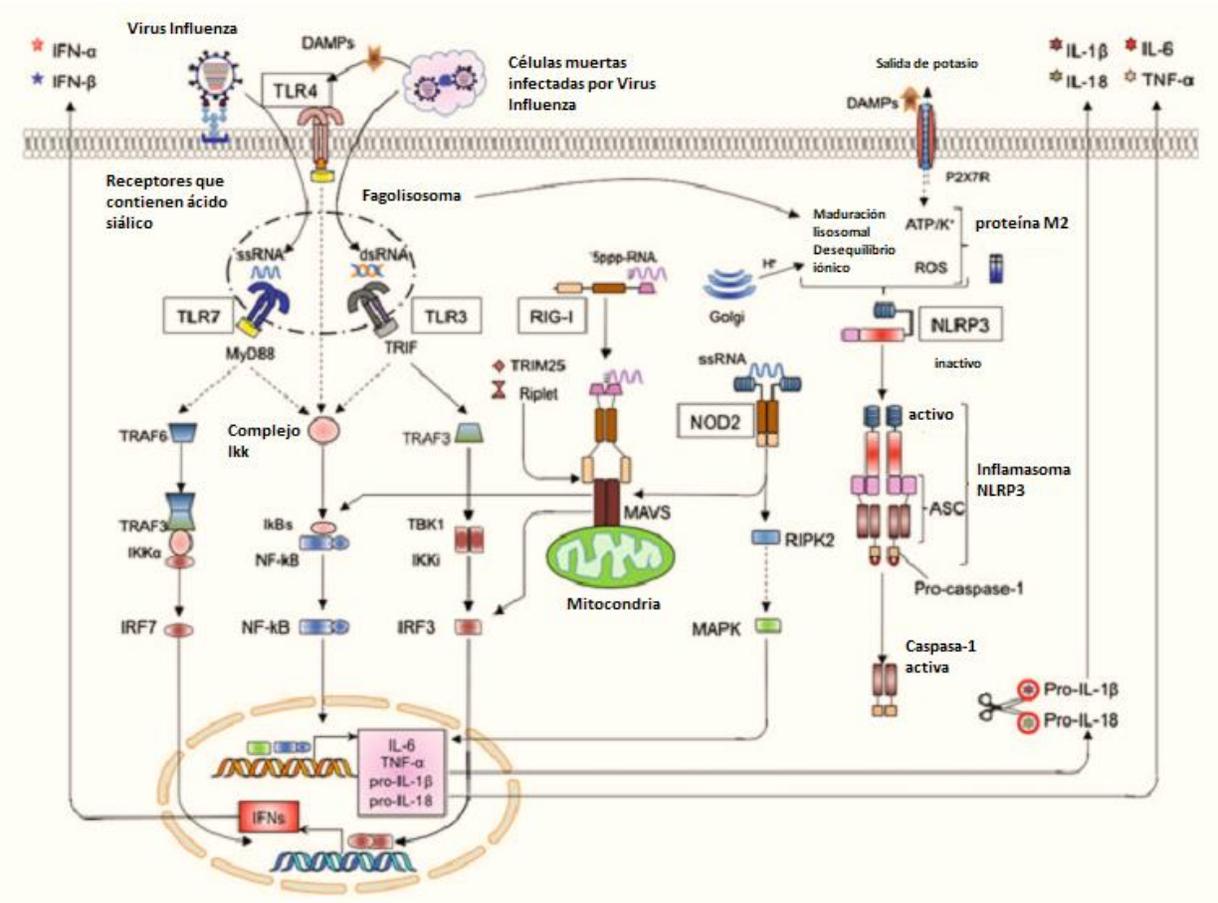


Figura 5. Reconocimiento de Virus Influenza A por receptores de reconocimiento de patrones. La activación de TLRs debido al reconocimiento de RNA viral (TLR3, TLR7) o la unión a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs; TLR4) recluta moléculas adaptadoras (MyD88 y TRIF) activando distintas vías de señalización que culmina con la activación de factores de transcripción (IRF3/7 y NFκB) para inducir la producción de IFN tipo I y citocinas inflamatorias (IL-6, TNF, pro-IL-1β e -18). El reconocimiento de 5' ppp-RNA por RIG-I activa el reclutamiento de MAVS a la mitocondria, el cual induce la producción de citocinas a través de IRF3/IRF7. La activación de NLRP3 mediado por diversos estímulos, dependiente de la proteína M2, recluta ASC, el cual interactúa con pro-caspasa-1 para formar el inflamasoma NLRP3. La activación de caspasa-1 rompe a pro-IL-1β e -18 para producir las formas maduras de estas citocinas. Modificado de Pulendran y Maddur, 2014(28).

Respuesta celular

Macrófagos alveolares

Los macrófagos alveolares (AM), en condiciones normales contribuyen a generar un ambiente inmunosupresor produciendo prostaglandinas, así como TGF β y ácido retinoico, los cuales inducen el desarrollo de células T reguladoras Foxp3⁺ (Treg). Además, la capacidad fagocítica y de presentación de antígeno de AM está disminuida, debido a la baja expresión de moléculas coestimuladoras, sin embargo, los AM retienen su habilidad de migrar desde pulmón hacia nódulos linfoides(29).

La importancia de estas células en la infección por IAV se ha determinado en ratones deficientes de GM-CSF (inductor de fenotipo AM) y en ratones en los cuales esta subpoblación celular fue eliminada, los cuales mueren debido a la infección con dosis bajas de influenza. Los mecanismos de protección por AM están asociados a la prevención de hipoxia debido a la fagocitosis de células infectadas apoptóticas y fosfolípidos de surfactante que usualmente se acumulan durante la infección y que interfieren en el intercambio gaseoso (30); supresión de la inflamación por medio de la interacción del receptor de CD200 (CD200R, presente en AM) y su ligando en células epiteliales que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de leucocitos (31); el receptor scavenger MARCO (receptor de macrófagos con estructura de colágeno, por sus siglas en inglés) también actúa como represor de la inflamación inhibiendo el flujo de neutrófilos (32), y los macrófagos alveolares interfieren con la propagación del virus debido a que secretan interferones tipo I, ya que también pueden infectarse con IAV (33).

Células NK

Las células NK son linfocitos granulares efectores del sistema inmune innato que son importantes en el control de las infecciones virales (34). Estas células tienen una representación importante en pulmón, la cual aumenta aún más en respuesta a la infección por IAV (35); una citocina importante en

su reclutamiento es la IL-15(36). Se ha reportado que ratones que carecen de células NK o del gen que codifica para el receptor de células NK *Ncr1*, presentan un retraso importante en la eliminación de la infección (37), aunque existen otros reportes que sugieren que, más que tener un efecto protector, contribuyen a la patología causada por IAV cuando se usan dosis altas de virus (38).

El principal mecanismo de protección ante la infección por virus influenza es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés); la cual consiste en el reconocimiento de células infectadas por medio de receptores Fc de anticuerpos específicos para antígenos virales, los cuales comúnmente se expresan en la superficie de células infectadas (39). Adicionalmente, las células NK pueden unir ácido siálico a hemaglutinina de virus influenza por medio del receptor *NCR1* (40). Por otro lado, las células NK participan en la reparación de tejido pulmonar dañado por influenza secretando IL-22 (41).

Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) se consideran orquestadoras de la respuesta inmune, debido a que tienen un papel importante en la iniciación de la inmunidad adaptativa y en la inducción de tolerancia contra antígenos propios. Estas células son consideradas células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, ya que tienen la capacidad de presentar péptidos derivados de antígenos endógenos (a través de MHC clase I) o exógenos (vía MHC clase II) a células T $CD4^+$ y $CD8^+$ respectivamente, iniciándose así su respuesta. Además, pueden presentar péptidos exógenos vía MHC-I a células T $CD8^+$ (presentación cruzada) (42).

Las células dendríticas se dividen en células dendríticas plasmocitoides $CD11c^{lo}$ (DCp), las cuales son la mayor fuente de IFN- α ; y células dendríticas de origen mieloide o convencionales $CD11c^{hi}$ (cDC). Estas últimas, a su vez se subclasifican en células dendríticas residentes y migratorias. Las DC residentes se pueden subdividir con base en la expresión de los marcadores $CD4^+$ y $CD8^+$ (DCs $CD8^+$,

DCs CD4⁺ y DCs CD8-CD4⁻). Mientras que las células dendríticas migratorias se subclasifican con base en la expresión de los marcadores CD103 y CD11b (CD103⁺CD11b⁻ y CD103-CD11b⁺). En condiciones normales en el tracto respiratorio, las DCs CD103⁺CD11b⁻ se encuentran en el epitelio respiratorio y tienen la capacidad de extender sus dendritas al lumen alveolar para captar antígeno, mientras que las DC CD103-CD11b⁺ y las DCp están localizadas en lamina propia, debajo del epitelio. Además, todas ellas se encuentran en el septo alveolar del parénquima pulmonar(43).

Las DC adquieren el antígeno de IAV por medio de endocitosis de fragmentos procedentes de células epiteliales infectadas muertas o por la liberación de viriones, además de ser susceptibles a la infección por virus influenza. Una vez capturado el antígeno, las DC entran a un proceso de maduración dirigido por la señalización de TLR-7 o RIG-I, bajo la influencia de IFN tipo I producidos por macrófagos y DCp. Después de esto, las DCs maduras adquieren el receptor CCR7 y migran hacia nódulos linfoides (LN) mediado por quimiocinas como CCL2, CCL5, CCL30 y CCL21 liberadas por células epiteliales y endoteliales, donde las DCs CD103⁺ pueden transferir el antígeno a DCs CD8⁺, aumentando así el número de células dendríticas activadoras de células T (28, 43).

Dentro de las poblaciones de DCs existe una división de funciones en LN. Las DCs CD103⁺ migratorias y las DCs CD8⁺ residentes se encargan de la presentación cruzada de antígenos virales procedentes de células apoptóticas infectadas a células T CD8⁺ naïve en etapas tempranas de la infección. Por otro lado, las DCs CD11b⁺ están más relacionadas con la presentación de antígenos a células CD8⁺ en etapas tardías de la infección expandiendo el pool de células T efectoras y en la generación de memoria central de estas células. Para el caso de células T CD4⁺ naïve, tanto DCs CD103⁺ como CD103⁻ son eficientes en su activación(28).

Inmunidad Adaptativa

La infección por el virus influenza induce inmunidad celular representada por células T, e inmunidad humoral llevada a cabo por anticuerpos secretados por células B. Ambas representan la inmunidad adaptativa contra el virus influenza (**Figura 6**).

Respuesta de células T

La eficiente eliminación de virus influenza y el establecimiento de inmunidad protectora de memoria requiere de la activación de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y cooperadores (CD4⁺). Después de la presentación de antígeno por parte de células dendríticas y de la expansión clonal que ocurre en nódulos linfoides secundarios, se da una migración de linfocitos activados hacia el pulmón, la cual está regulada por la expresión selectiva de la integrina CD11a (44).

Una vez en pulmón, los mecanismos efectores usados por células T CD8⁺ para eliminar virus influenza son: (1) lisis de células infectadas por exocitosis de gránulos de granzima y perforina, (2) inducción de apoptosis de células infectadas dependiente de la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), debido a la expresión de ligando de FAS o TRAIL, y (3) producción de mediadores pro-inflamatorios y reguladores(45).

Las células T CD4⁺ por su parte, han demostrado exhibir actividad citotóxica, sin embargo su principal papel en la protección es la secreción de citocinas que cooperan con la activación y diferenciación de células T y B. La infección por IAV induce diversos fenotipos de células T CD4⁺ cooperadoras (Th) que se distinguen por el patrón de citocinas que secretan. Las células Th2 producen IL-4 e IL-13 y son consideradas promotoras de respuestas de células B, mientras que las Th1 secretan IFN- γ e IL-12, que están involucradas en respuestas celulares(45).

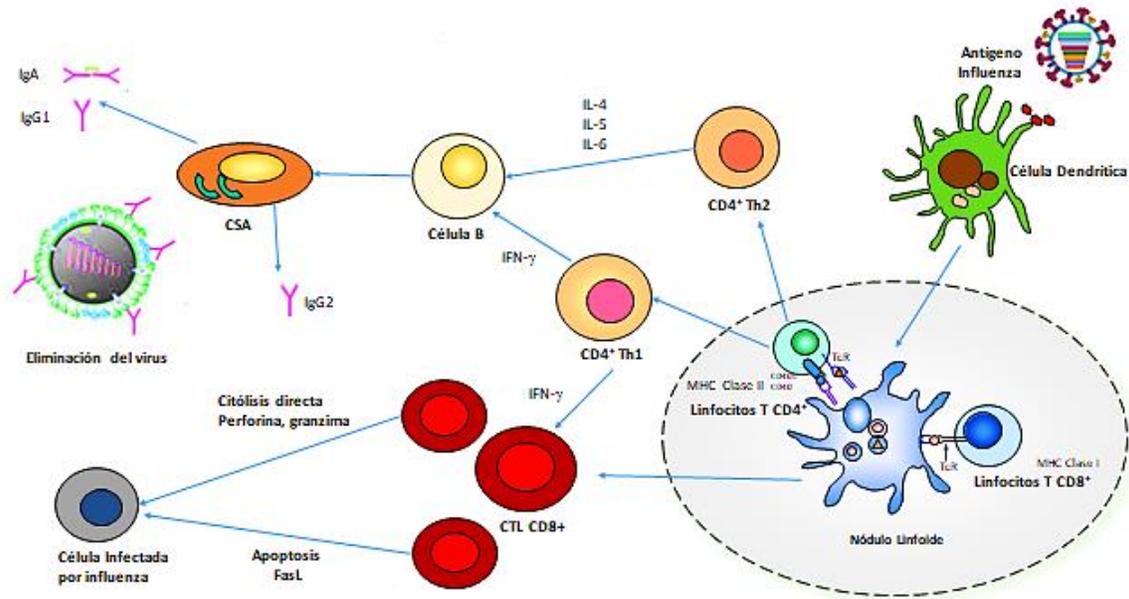


Figura 6. Inmunidad humoral y celular al Virus Influenza. La respuesta inmune celular se inicia después del reconocimiento de antígenos virales presentados vía MHC-I y -II por APC, lo cual permite la activación, proliferación y diferenciación de células T CD4⁺ y CD8⁺. Las células T CD4⁺ pueden cooperar directamente para producir anticuerpos o en la respuesta inmune efectora de células CD8⁺, las cuales eliminan células infectadas por citólisis directa o induciendo apoptosis. Los anticuerpos específicos del dominio globular de HA neutralizan el virus, previniendo la infección. Otros anticuerpos, aquí no ilustrados, dirigidos para otros determinantes antigénicos pueden neutralizar, o bien, cooperar con células NK y macrófagos para eliminar células infectadas.

Adicionalmente, las células T reguladoras (Treg) suprime las respuestas T cooperadoras y de células CD8+, mientras que las células Th17 producen IL-6 que suprime las respuestas reguladoras y promueve las cooperadoras. Además, las células T foliculares (Tfh) promueven la formación de centros germinales (GC) en nódulos linfoides secundarios donde se generan anticuerpos de alta afinidad (42, 46).

Después de la resolución de la infección, existe una fase de contracción en donde la mayoría de las células T mueren, mientras que una pequeña población se diferencia en células T de memoria, las cuales ante una segunda infección permiten una respuesta más rápida y eficiente. El desarrollo y mantenimiento de estas células en el tracto respiratorio y nódulos linfoides está altamente regulado por la persistencia de células dendríticas que les continúan presentando antígeno de influenza. Las células T de memoria inducidas en una infección primaria pueden responder a una subsecuente infección con otra cepa de virus influenza, ya que éstas generalmente reconocen epitopos conservados en proteínas internas como NP y M1 (inmunidad heterosubtípica)(47).

Respuesta de células B

Los primeros anticuerpos que contribuyen a eliminar la infección son secretados por células B-1 en las cavidades pleural y peritoneal. Estos anticuerpos son polirreactivos, de baja afinidad, principalmente del isotipo IgM y debido a que son producidos en ausencia de infección son llamados “anticuerpos naturales”. Al no ser específicos y ser de baja afinidad, usualmente esta barrera inmunológica es superada por los IAV (48).

Para que una respuesta de célula B específica de virus influenza ocurra, el antígeno debe llegar a nódulos linfoides donde tiene lugar el primer contacto con células B naive. A las 48-72 h después del inicio de la infección, anticuerpos de baja afinidad son secretados por plasmablastos extrafolículos (células secretoras de anticuerpos de vida corta). Esta respuesta rápida es importante en infecciones

primarias porque contribuye a mejorar el pronóstico de la enfermedad y pueden ser producidos en una manera tanto dependiente como independiente de células T (49).

Algunas de las células B específicas activadas migran hacia los bordes de los folículos B, donde interactúan con células T CD4⁺ y comienzan reacciones de centro germinal, que conlleva a la generación de anticuerpos de alta afinidad, los cuales son la consecuencia más deseable de la vacunación o la infección, ya que estas células B son las responsables de la memoria de larga duración. Las células de memoria que se generan, ante una reexposición al antígeno, proliferarán y secretarán anticuerpos de una manera más rápida (50).

Los principales isotipos de anticuerpos en la respuesta humoral contra IAV son IgA, IgM e IgG. Los anticuerpos IgA son producidos localmente y transportados a lo largo de la mucosa respiratoria por transporte transepitelial proporcionando protección local. Los anticuerpos séricos IgG transudan en el tracto respiratorio y son los responsables de la protección a largo plazo. Los anticuerpos IgM actúan activando complemento y son indicadores de infección primaria (42).

La respuesta de anticuerpos protectores puede ser dividida en neutralizantes y no neutralizantes. Los primeros, usualmente se dirigen hacia el dominio globular de la HA e impiden la unión al receptor, por lo que neutralizan al virión, previniendo la infección. Estos anticuerpos anti-HA se dirigen a al menos cinco sitios de reconocimiento localizados rodeando al sitio de unión al receptor, los cuales están sujetos a variación antigénica, y debido a esto las vacunas estacionales actuales tienen que ser reformuladas anualmente. Por otro lado, aunque los anticuerpos anti-NA ofrecen inmunidad permisiva porque no impiden la infección, pero limitan la carga viral interfiriendo con la salida de los viriones al obstaculizar la actividad enzimática de NA (**Figura 7**).

Otros anticuerpos no neutralizantes actúan por diversos mecanismos como activación de complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADP); los cuales dependen de la expresión de antígenos virales en la superficie de células infectadas y de la cooperación con diversos tipos celulares como células NK y macrófagos por medio de sus receptores Fc (51).

Inmunidad Heterosubtípica

La inmunidad heterosubtípica (HSI) se define como la inmunidad generada por un determinado subtipo de VIA que protege contra cualquier reto con otro subtipo viral (52). La primera evidencia de IHS fue reportada por *Schulman y Kilbourne*, cuando al infectar ratones con una cepa H1N1 y posteriormente retarlos con una dosis letal de H2N2, presentaron una reducción en títulos virales, patología y mortalidad. Ellos atribuyeron esta protección a la inducción de células T específicas, y descartaron la inmunidad humoral como mecanismo de IHS debido a que no hubo actividad neutralizante para la segunda cepa en este experimento (53). Además, en humanos, durante la pandemia de 1957 se observó que individuos que habían experimentado infecciones previas con virus H1N1, desarrollaron menos severidad asociada a la infección por la cepa H2N2 pandémica (54).

El principal mecanismo de HSI ha sido atribuido principalmente a linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺, ya que la mayoría del repertorio está dirigido a péptidos derivados de proteínas internas altamente conservadas. Experimentos en ratón apoyan esta teoría: la transferencia adoptiva de CTL procedentes de animales previamente infectados con una dosis subletal de una cepa de virus influenza, protegen contra el reto letal con otra cepa; además, en ratones deficiente de estas células la protección observada se pierde (42). La participación de CTL en HSI también ha sido confirmada en humanos, *McMichael et al* inoculó voluntarios con una cepa de virus influenza, y reportó que CTL derivados de estos tenían actividad cruzada contra otras cepas, mientras que los anticuerpos no (55).

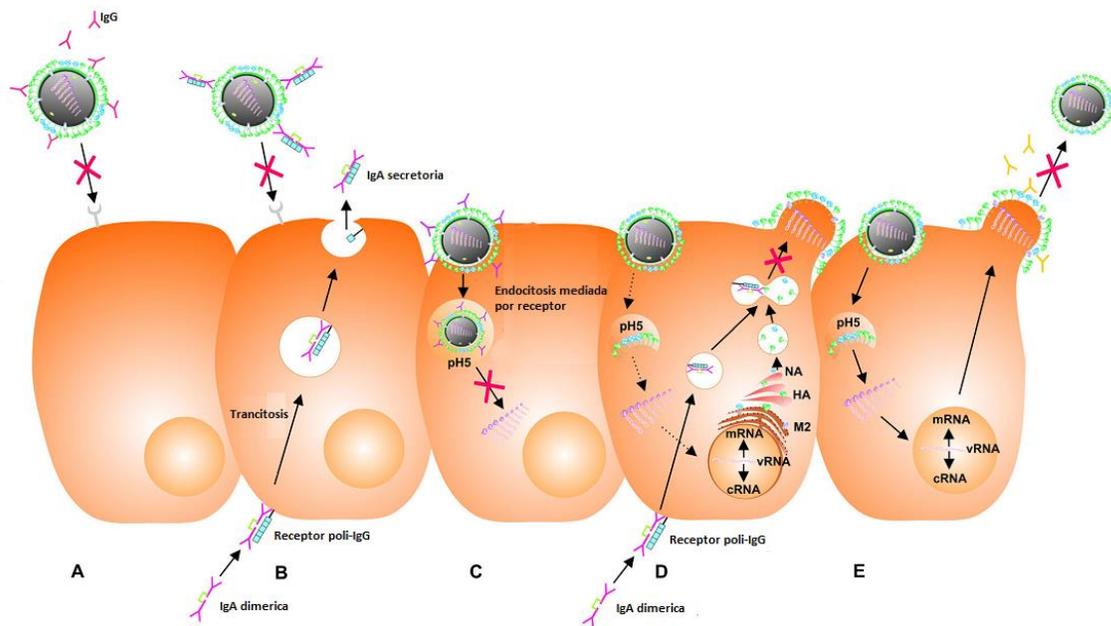


Figura 7. Mecanismos de protección de anticuerpos contra Virus Influenza A (A y B) Anticuerpos IgG o IgA de mucosa específicos para el dominio globular de la hemaglutinina previenen la infección bloqueando la adherencia a receptores celulares. (C) Anticuerpos anti-tallo de la hemaglutinina previenen la infección al inhibir la fusión de las membranas viral y endosomal. (D) Anticuerpos anti-M2 intracelulares inhiben el ensamblaje del virus al impedir interacciones necesarias entre M1 y las vRNPs. (E) anticuerpos anti-NA impiden la salida de la progenie viral. Modificado de Staneková y Varečková, 2010(56).

Las células T cooperadoras CD4⁺ también contribuyen a HSI. Se ha reportado que en ausencia de células T CD4⁺ de memoria, la respuesta de células T CD8⁺ de memoria es defectuosa, lo que tiene como consecuencia una respuesta secundaria limitada de estas células. Por lo que, es necesario que las vacunas también induzcan respuestas cooperadoras adecuadas, además de las células T CD8⁺ (57).

Por otro lado, a pesar de que en un inicio, la actividad de los anticuerpos parecían no ser relevantes para HSI, en la actualidad existe interés en la descripción y caracterización de inmunidad heterosubtípica mediada por anticuerpos. La respuesta protectora basada en Abs se asocia principalmente a inmunidad homosubtípica, en donde los anticuerpos se dirigen en mayor medida al dominio globular de la hemaglutinina, sitio que es altamente variable. Sin embargo, en los últimos años se han descrito anticuerpos, cuyos epitopes se concentran en áreas conservadas, como el tallo de HA, el ectodominio de la proteína M2 y proteínas internas como NP, los cuales han mostrado tener una alta actividad cruzada y ser protectores *in vivo*. No obstante, estos anticuerpos son subdominantes con respecto a los sitios de respuesta homosubtípica localizados en el dominio globular de la HA(58).

Vacunas contra Influenza

Estrategia actual

Actualmente se cuentan con dos tipos principales de vacunas que son administradas anualmente: las vacunas inactivadas y las de virus vivos atenuados. Las vacunas inactivadas constan de tres o cuatro cepas de virus influenza (H1N1, H3N2 y B; y dos cepas de virus B, para el caso de las vacunas cuadrivalentes), sin adyuvante, administradas intramuscularmente, las cuales se preparan mediante el cultivo en embriones de huevo de las cepas virales que las componen, las cuales son previamente

manipuladas para que contengan todos los genes internos del virus PR8 (el cual está perfectamente adaptado al cultivo en huevo) y los dos genes de las proteínas HA y NA de los virus circulantes.

Las vacunas inactivadas pueden ser presentadas como vacunas de virus completos, los cuales después del cultivo son químicamente inactivadas con formalina o β -propiolactona; vacunas disgregadas, que añaden un paso extra que consiste en disgregar a los viriones por medio de detergente, para así disociar la membrana viral y hacer accesible todas las proteínas; y las vacunas de subunidades, en la cual la HA de los virus es purificada. Por su parte, las vacunas atenuadas, son virus adaptados al frío, que se administran intranasalmente, y están manipulados para no replicar bien en el tracto respiratorio, pero sí en cavidades nasales (59).

Para ambos tipos de vacunas, el principal mecanismo de protección es la inducción de anticuerpos neutralizantes con especificidad para el dominio globular de la HA, y su efectividad se correlaciona con ensayos de inhibición de la hemaglutinación o neutralización, en donde un título mayor o igual a 40 es indicativo de protección. Desafortunadamente, la efectividad de estas vacunas dependen de una correcta elección de las cepas que las componen cada año, y no son efectivas en inducir protección contra virus ocasionantes de pandemias, por lo que actualmente los esfuerzos se están centrando en el desarrollo de una vacuna universal heterosubtípica (59).

Candidatos para el desarrollo de una vacuna universal heterosubtípica

El enfoque actual para el diseño de una vacuna universal heterosubtípica se basa en el uso de determinantes antigénicos altamente conservados de células T y/o células B, junto con estrategias vacunales que aumenten su inmunogenicidad. Dichos determinantes antigénicos suelen estar menos expuestos al reconocimiento del sistema inmune, y por ende menos sujetos a cambios antigénicos derivados de la presión inmune (60).

Vacunas basadas en células T

Como se mencionó previamente, las células T son importantes componentes de la inmunidad heterosubtípica, lo que las ha llevado a ser reconocidas como candidatas para el desarrollo de una vacuna universal. La mayoría de estas incluyen a las proteínas internas conservadas NP, PA o M1, las cuales son capaces de generar memoria de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. El principal inconveniente de las vacunas basadas en células T es la amplia variedad de moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) clase I y II en la población humana; por lo que en los últimos años se están tratando de identificar epítomos altamente conservados que sean capaces de unirse a supertipos de HLA (4).

Algunos ensayos clínicos de propuestas de vacunas universales han sido realizados. La vacuna basada en células T MVA-NP+M1 consiste en el virus vaccinia Ankara (deficiente en replicación) que expresa las proteínas M1 y NP de la cepa A/Panama/2007/1999 (H3N2). La vacuna MVA-NP+M1 demostró ser eficaz, segura e inmunogénica: los individuos vacunados presentaron respuestas de linfocitos T citotóxicos incrementadas comparado con los controles, y aquellos individuos que fueron infectados experimentalmente tuvieron una liberación de viriones por menos días que aquellos sin vacunar (61). Otras vacunas han buscado inducir respuesta de tanto células T como de células B usando epítomos específicos. La vacuna Multimeric-001 está diseñada con epítomos restringidos a subtipos de HLA prevalentes en la población humana, lineares y conservados de las proteínas HA, NP y M1 de virus influenza A y B unidos a flagelina. Los individuos vacunados presentaron seroconversión, lisis de células mediado por complemento, y proliferación de células T, parámetros indicativos de inmunogenicidad (62).

Vacunas basadas en el ectodominio de la proteína M2 (M2e)

El ectodominio N-terminal de la proteína M2 (M2e) se encuentra altamente conservado entre subtipos virales, particularmente entre cepas que infectan una misma especie (>99% de identidad). M2e ha

mostrado inducir respuestas inmunes heterosubtípicas protectoras basada en anticuerpos y células T en modelos experimentales animales(63, 64), por lo que es considerado como un candidato para el diseño de la vacuna universal contra influenza. Sin embargo, la inmunogenicidad de M2e en respuesta a infección natural o a vacunación estacional es pobre debido a la baja densidad de M2 en el virion con respecto a la concentración de las glicoproteínas de membrana HA y NA, por lo que para el diseño de vacunas basadas en M2e se han usado diversas estrategias para aumentar su inmunogenicidad, como el uso de proteínas acarreadoras (65), conjugado a nanopartículas de oro(66), como vacunas de DNA(67), insertado en partículas parecidas a virus (VLPs)(68), entre otras. La eficacia de dos vacunas basadas en M2e han sido evaluadas en ensayos clínicos: ACAM-FLU-A que consiste de M2e unido a la proteína del core de hepatitis B (M2e-HBc) y una vacuna de M2e unido a flagelina (STF2.4xM2e), ambas demostraron ser inmunogénicas (69)

El principal mecanismo de protección de las vacunas basada en M2e son anticuerpos no neutralizantes, los cuales reconocen a su ligando en la membrana de células infectadas y actúan mediante mecanismos efectores basados en su dominio Fc promoviendo ADCC y/o fagocitosis de células infectadas. Además, se han descrito epitopes de células T CD4⁺ y CD8⁺ dentro de M2e, los cuales pueden participar en la protección, lo cual ha sido confirmado por experimentos de eliminación de células T en ratones vacunados (67, 70).

Vacunas basadas en el tallo de la hemaglutinina

A diferencia de la cabeza de HA, el tallo tiene un alto grado de conservación en su secuencia. En los últimos años se han descrito anticuerpos dirigidos hacia este dominio, los cuales presentan un alto grado de reactividad cruzada contra virus con HA del grupo 1, grupo 2, e inclusive algunos tienen capacidad de reaccionar contra ambos. Estos anticuerpos no inhiben la hemaglutinación, sin embargo

son neutralizantes, debido a que interfieren con la fusión de las membranas viral-endosomal al impedir cambios conformacionales necesarios para la exposición del péptido de fusión (71).

Al igual que los anticuerpos anti-M2e, los anti-tallo-HA son subdominantes con respecto a los anticuerpos dirigidos contra la HA. Sin embargo, se ha hipotetizado que la introducción de un nuevo virus pandémico (con diferente dominio globular) contribuye a la producción de estos anticuerpos. Esto resulta de la observación de que posterior a la pandemia del 2009, los anticuerpos anti-tallo-HA aumentaron en pacientes infectados o vacunados(72). Este dato ha sido confirmado también en ratón(73).

Debido a la observación anterior, con el objetivo de crear una vacuna universal contra virus influenza basado en anticuerpos anti-tallo, se están usando estrategias que permitan dirigir la respuesta inmune hacia este dominio mediante la inmunización secuencial de hemaglutininas que varíen o carezcan del dominio globular de HA(74, 75), o enmascarando los sitios antígenicos inmunodominantes presentes en la cabeza, añadiendo sitios de glicosilación que impidan el reconocimiento de estos(76).

Finalmente, es importante la continua investigación de nuevos candidatos antígenicos, así como de nuevas estrategias de vacunación que permitan el desarrollo de una vacuna que sea efectiva contra cualquier reto de virus influenza. A continuación se describirá una estrategia basada en el conocimiento de la biología de las células presentadoras de antígeno, particularmente de células dendríticas, la cual ha mostrado inducir potentes respuestas de células T y B contra antígenos particulares, y que podría ser aplicada para el diseño de una vacuna heterosubtípica contra influenza.

Direccionamiento de antígeno a células dendríticas

Las células dendríticas son determinantes críticos de la vacunación debido a su papel en la activación y regulación de respuesta de células T y B. En la periferia, las DC funcionan como centinelas que capturan y procesan antígeno para su presentación por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad a células T: las moléculas MHC-I presentan antígeno hacia células T CD8⁺, mientras que las moléculas de MHC-II son reconocidas por linfocitos T CD4⁺. La respuesta inmune inducida por DC depende del ambiente en el cual el antígeno es capturado: en ausencia de señales inflamatorias, las DC son tolerogénicas, mientras que en respuesta a infección, inflamación o en presencia de adyuvante, las DC maduran e inducen inmunidad de células T efectiva (77).

El conocimiento de la biología de DC ha permitido su inclusión en dos principales estrategias de vacunación, particularmente contra patógenos intracelulares y enfermedades para las cuales la inmunidad celular es sumamente importante, como el cáncer. La primera es la inmunoterapia con DC generadas *ex vivo*, cargadas con antígenos, la cual es laboriosa y cara; y la segunda y más promisorias, que es el direccionamiento selectivo de antígeno a DC mediante el uso de ligandos naturales o anticuerpos monoclonales específicos para receptores endocíticos, con el fin de incrementar la captación y procesamiento del antígeno (78).

El direccionamiento de antígeno a DC surge de la observación de *Snider y Segal* de que antígenos dirigidos específicamente a receptores Fc o moléculas de MHC en APC *in vitro*, resultan en una presentación de antígeno a células T incrementada (79). Además, estudios *in vivo* demostraron que las respuestas humorales y celulares se incrementaban cuando antígenos eran direccionados a moléculas de superficie en ausencia de adyuvante (80). Posteriormente, se identificaron receptores

especializados en la internalización de antígeno, como los receptores de lectina tipo C (CLR, por sus siglas en inglés) los cuales han sido los más usados para esta estrategia de vacunación (81).

Receptores de lectina tipo C

Las lectinas tipo C unen carbohidratos en una manera dependiente de calcio (Ca^{2+}) usando dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés). Los receptores de lectinas tipo C (CLR) comprenden una familia amplia de receptores, los cuales unen a sus ligandos a través de uno o más CRD o de dominios parecidos a lectinas tipo C (CTLD, por sus siglas en inglés), los cuales no necesariamente reconocen ligandos de carbohidratos(82).

Existen dos tipos de CLR en la superficie de DC, tipo I y II, los cuales se diferencian en la orientación de su extremo amino terminal. Los CLR tipo I tienen su extremo amino terminal orientado al exterior de la célula, mientras que los CLR tipo II lo tienen orientado al citoplasma. Otra importante diferencia es que los CLR tipo I pueden tener varios dominios CRD o CTLD, mientras que los tipo II hasta ahora identificados tienen solo uno (82) (**Figura 8**).

Los CLR expresados por DC interactúan con patógenos a través del reconocimiento manosa, fucosa y glucano. Debido a esto, los CLR pueden reconocer la mayoría de los patógenos humanos; la manosa específicamente permite el reconocimiento de virus, hongos y micobacterias; las estructuras de fucosa se expresan en ciertas bacterias y helmintos; y los glucanos están presentes en micobacterias y hongos (83). La unión del ligando al CLR resulta en la endocitosis del antígeno, seguido del transporte a compartimientos endocíticos para su carga a moléculas de MHC y su consecuente presentación a células T. Además, algunos contienen motivos citoplasmáticos de señalización de activación o de inhibición, por lo que pueden inducir respuestas inmunes diversas (84).

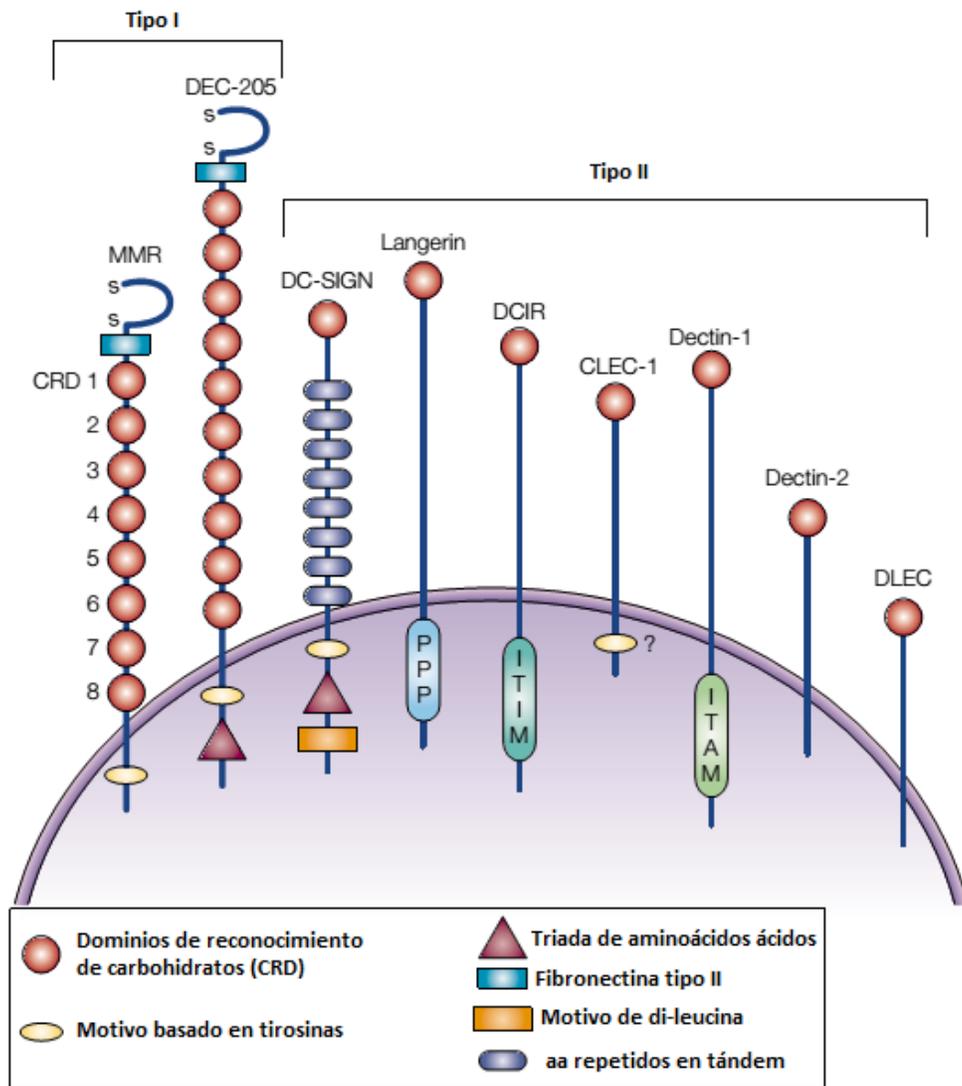


Figura 8. Lectinas tipo C en células dendríticas. Los receptores endocíticos de las células dendríticas pertenecen en su mayoría a la familia de receptores de lectinas tipo C. Estos son ampliamente expresados en células presentadoras de antígeno, particularmente en células dendríticas. Todos ellos tienen dominios de reconocimiento de carbohidratos, que se ilustran en círculos rojos, y algunos median endocitosis, ya que tienen un motivo basado en tirosinas que dirige la formación de vesículas de clatrina. Aparte algunos de ellos contienen una secuencia señal basada en aminoácidos ácidos (Asp Glu Asp), que los dirige directamente hacia endosomas tardíos, con ello se estimula el procesamiento y la presentación de antígeno. Modificado de Figdor et al, 2002(82).

Los distintos tipos de DC expresan un patrón diferente de CLR, y por lo tanto la elección del receptor al cual se pretende direccionar el antígeno, va depender del tipo de respuesta que se desee lograr y del subtipo de célula dendrítica a la cual se quiere direccionar. Dentro de todos los CLR hasta ahora descritos, uno de los más estudiados y promisorios para esta estrategia de vacunación es DEC-205.

DEC-205

DEC-205 es un receptor tipo I de lectinas tipo-C de 205 kDa que contiene 10 CTLD y un dominio N-terminal rico en cisteínas seguido de un dominio parecido a fibronectina tipo II, el cual está involucrado en interacciones celulares y transporte de antígeno. El tallo citoplasmático de DEC-205 tiene secuencias que regulan su dirección intracelular y su reciclaje a la superficie de la célula: un motivo basado en tirosinas (FSSVRY), que dirige el antígeno hacia vesículas recubiertas de clatrina, y una triada de aminoácidos ácidos (EDE) que permite su direccionamiento hacia endosomas tardíos. Por lo tanto, DEC-205 internaliza antígeno por medio de endocitosis mediada por receptor que permite una presentación de antígeno incrementada a células T a través de endosomas tardíos y un eficiente reciclaje del receptor (82).

DEC-205 se expresa en niveles altos en epitelio tímico cortical, DC medulares tímicas (CD11c+, CD8+) y otras DC periféricas (CD11c+CD8+, DC de nódulos linfoides y bazo, DC de piel/intersticiales y células de Langerhans). En humanos, DEC-205 es expresado a niveles intermedios por células B y a bajos niveles por células NK, células T y pDC (85, 86).

Los ligandos naturales de DEC-205 no están aún bien descritos, sin embargo se sabe que dos áreas de esta molécula reconoce ligandos expresados durante apoptosis o necrosis en múltiples líneas celulares. Por lo que se sugiere que la principal función de este receptor endocítico es el

reconocimiento de células muertas para la captura de antígenos propios y la generación de tolerancia periférica hacia ellos (87).

DEC-205 fue el primero y ha sido el receptor más usado para propósitos de direccionamiento de antígeno. Diversos reportes en modelo murino han demostrado que en presencia de adyuvante, el direccionamiento de antígenos hacia DEC-205 incrementa la presentación de antígeno, proliferación y acumulación de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas, y su subsecuente diferenciación hacia células efectoras(88, 89). De manera relevante, en ausencia de adyuvante, el direccionamiento de antígenos se asocia con tolerancia de células T, asociado a la generación de células T reguladoras CD25⁺(90, 91). Por otro lado, esta estrategia también está relacionada con un aumento en la respuesta humoral contra antígenos específicos, lo cual se asocia con un incremento en el número de células T cooperadoras(92, 93) (**Figura 9**).

El potencial de DEC-205 como blanco de direccionamiento de antígeno ha sido evaluado en varios modelos de vacunación (**Tabla 1**). Por ejemplo, en el laboratorio Badillo *et al* reportaron reducción en la carga viral en una infección con rotavirus después de la administración s.c. de un anticuerpo anti-DEC205 acoplado a la proteína VP6 de este virus. Esta protección fue dependiente de la generación de células T CD4⁺ de memoria con un fenotipo Th1 (94).

De esta manera, el direccionamiento de antígenos hacia células dendríticas utilizando DEC-205 como un modelo de vacunación contra influenza, representa una alternativa para la generación de respuesta inmune heterosubtípica

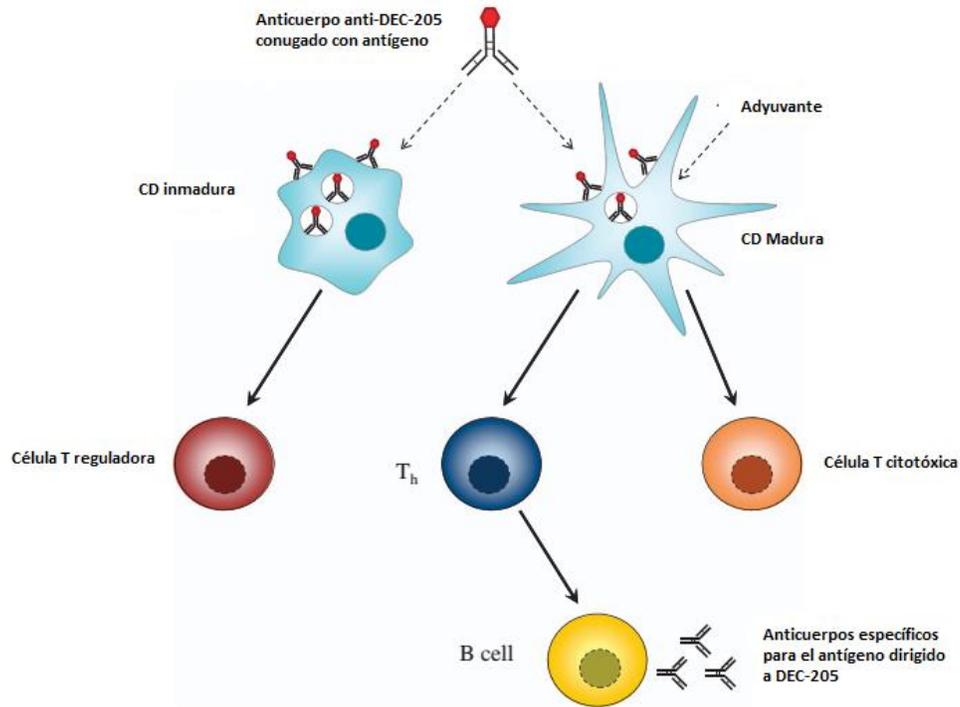


Figura 9. Respuestas inmunes inducidas mediante el direccionamiento de antígeno hacia DEC-205. La inmunización de anticuerpos conjugados con anticuerpos anti-DEC-205 en ausencia de adyuvante lleva a la generación de tolerancia, mediante la inducción de células T reguladoras. En contraste, cuando se co-administra una señal de maduración para células dendríticas (adyuvante) con el anticuerpo conjugado, se inicia una respuesta inmune potente de células T citotóxicas y cooperadoras. Estas últimas llevan a un aumento en la respuesta de anticuerpos específicos. Modificado de Macri et al, 2016(77).

Tabla 1. Estudios de Vacunación con DEC-205

Modelo	Antígeno (vía)	Adyuvante	Resultado	Autor, año
<i>In vitro</i> . Células dendríticas derivadas de monocitos de pacientes con cáncer	NY-ESO-1		Inducción de respuesta de células TCD4 ⁺ y CD8 ⁺ a través de la presentación de antígenos en moléculas de MHC clase I y II	<i>Tsuji et al, 2011(95)</i>
Ratón BALB/c	Antígeno 85B de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB) (s.c)	Anticuerpo anti-CD40	Aumento de respuestas humorales y celulares Disminución en la carga bacteriana en pulmones de ratones infectados con MTB	<i>Stylianou et al, 2011(96)</i>
Ratón BALB/c	LCrV de <i>Yersinia pestis</i> (i.n.)	Poly I:C	Inducción de células TCD4 ⁺ en vías respiratorias y aumento en respuesta de anticuerpos IgG e IgA en pulmón	<i>Do et al, 2012(97)</i>
Ratón BALB/c	Dominio III de la proteína E de Virus Dengue	Poly I:C	Incremento en producción de anticuerpos específicos y respuesta de células T	<i>Coconi-Linares et al, 2013(98)</i>
Ratón C57BL/6	Glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG)		Generación de tolerancia mediante el aumento de células T reguladoras. En el modelo de Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE), los ratones eliminaron la enfermedad en un 90%	<i>Ring et al, 2013(99)</i>
Ratón 8.3-NOD	Péptido IGRP ₂₀₆₋₂₁₄ asociado a diabetes tipo I		Eliminación de células T específicas de IGRP ₂₀₆₋₂₁₄ en páncreas	<i>Mukherjee et al, 2013(100)</i>
<i>In vitro</i> . Células dendríticas derivadas de	Péptido asociado a melanoma MART-1 ₂₇₋₃₅	TNFα, IL-6, prostaglandina E ₂ e IL-1β)	Aumento en respuestas de células T CD8 ⁺	<i>Saluja et al, 2014(101)</i>

monocitos de humano				
Ratón BALB/c	Proteína VP6 de rotavirus (s.c.)	Poly I:C	Disminución en la carga viral después del reto con Rotavirus, dependiente de la generación de células CD4 ⁺ de memoria con fenotipo Th1	<i>Badillo-Godinez et al, 2015(94)</i>
Ratón BALB/c	ESAT6 de MTB (s.c.)	Poly I:C	Aumento de células TCD4 ⁺ productoras de IFN- γ e incremento de actividad citotóxica y reducción de carga bacteriana en pulmón	<i>Silva-Sanchez et al, 2015(102)</i>
Ratón BALB/c	Antígeno preS de HBV	Poly I:C y CFA	Aumento en la generación de anticuerpos IgG1 e IgG2a, y prevención de la infección en ratones BALB/c	<i>Jing et al, 2015(103)</i>
Ratón humanizado HM-T	Proteína M1 de Virus Influenza		Aumento en la expansión de células TCD8 ⁺ <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>Graham et al, 2016(104)</i>
Ratón VILLIN-HA	HA ₁₁₀₋₁₂₀ de IAV		Inducción de protección en un modelo de colitis experimental debido a la generación de células TCD4 ⁺ Foxp3 ⁺ reguladoras	<i>Madwa et al, 2016(105)</i>
Ratón C57BL/6	MSP ₁₉ y MSP ₄₂ de <i>Plasmodium vivax</i>	Poly I:C	Incremento en la producción de anticuerpos cuando el fragmento que contiene epítomos de células TCD4 ⁺ y B (MSP ₄₂), mientras que la respuesta humoral no se aumentó cuando solo se direccionó el fragmento que contiene sólo el epítomo B (MSP ₁₉).	<i>Amorim et al, 2016(93)</i>
Pollo	Hemaglutinina de virus aviar H5N2	LPS	Aumento dependiente de la dosis en la producción de anticuerpos anti-HA	<i>Jáuregui-Zúñiga et al, 2017(106)</i>
Ratón BALB/c	Proteína VP6 de rotavirus (i.d. e i.p.)	Subunidad no tóxica de la toxina de cólera (CTB)	Disminución en la carga viral después del reto con Rotavirus. Infiltración de células CD4 ⁺ específicas en el intestino.	<i>Antonio-Herrera et al, 2018(107)</i>

JUSTIFICACIÓN

Los brotes anuales de infecciones por virus influenza son un problema grave de salud pública a nivel mundial, se estima que cada año se infecta aproximadamente el 10-20% de la población mundial, causando de 3-5 millones casos y hasta 500,000 muertes. Anualmente, la red de vigilancia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolla una vacuna trivalente basada en la predicción de próximas cepas circulantes, siendo ésta la mejor medida para prevenir infecciones por este virus (2).

Dichas vacunas estacionales promueven respuestas humorales caracterizadas por la generación de anticuerpos neutralizantes que se dirigen principalmente hacia el dominio globular de la hemaglutinina (HA1), el cual es altamente variable (drift antigénico), por lo cual no proporciona protección contra otros subtipos de virus influenza o contra potenciales virus ocasionantes de pandemias que surgen ocasionalmente por el rearreglo de genes de virus de aves y de cerdos con virus propios de humanos cuando infectan un mismo huésped (shift antigénico). Debido a esto, son necesarias nuevas perspectivas para el desarrollo de vacunas que generen una respuesta inmune protectora heterosubtípica, duradera y de alta afinidad (vacuna universal)(108).

El enfoque actual para el desarrollo de una vacuna universal contra influenza está dirigido hacia la selección de epítomos conservados de proteínas del virus, como es el caso del tallo de la hemaglutinina (HA2), el ectodominio de la proteína de la matriz 2 (eM2) y la nucleoproteína (NP), las cuales pueden generar memoria inmunológica y ofrecer protección contra retos heterosubtípicos; y por otro lado, a la utilización de estrategias que aumenten la inmunogenicidad de dichos determinantes antigénicos como el uso de proteínas de fusión, diseño de mutantes, vacunas de DNA, VLPs, uso de adyuvantes, producción de virus recombinantes, entre otras (68, 109-115).

Adicionalmente, el conocimiento de la función de células del sistema inmune ha permitido generar otras alternativas para favorecer la inducción de una respuesta protectora potente y específica. De esta manera, debido a que las DC son las encargadas de iniciar la respuesta inmune adaptativa, al captar, procesar y presentar antígeno a células T, se ha propuesto que al hacer más eficiente la captación de antígeno en estas células, se puede potenciar la respuesta inmune adaptativa específica (116).

En este sentido, el proceso de internalización de antígenos por células dendríticas involucra la unión a receptores endocíticos selectivamente expresados en su superficie tales como: receptores Fc de las inmunoglobulinas (CD32), receptores de complemento, integrinas, receptores tipo lectina C (CD209, CD205, BDCA, langerina, receptores de manosa) y receptores tipo *scavenger* (LOX-1, CD91, CD36). Por lo que una estrategia interesante de potenciamiento de la respuesta inmune, es el direccionamiento de antígenos virales hacia estos receptores endocíticos con el objetivo de incrementar la internalización de antígenos específicos (117).

Diversos receptores endocíticos han sido identificados en DC que han sido propuestos como blancos para el direccionamiento de antígeno. Entre ellos se encuentra DEC-205, el cual, es una proteína integral de membrana perteneciente a la familia de lectinas tipo C, la cual se une a carbohidratos y se expresa principalmente en células dendríticas, y secundariamente en macrófagos alveolares, células B y células epiteliales tímicas. Este receptor media varias funciones biológicas, como la unión y la internalización de ligandos para el consecuente procesamiento y presentación de antígeno (118).

El potencial de DEC-205 como blanco de direccionamiento de antígenos ha sido evaluado en algunos modelos de vacunación. Bonifaz *et al.*, encontraron que el acoplamiento de ovoalbúmina a un anticuerpo monoclonal anti DEC-205 indujo la presentación de antígeno por células dendríticas en nódulos linfoides a células T CD4⁺ y T CD8⁺ específicas de esta proteína hasta cuatrocientas veces

más eficiente que cuando ovalbúmina (OVA) fue administrada sin conjugar con el anticuerpo (88, 91). Por otro lado, la administración intranasal de un anticuerpo anti-DEC-205 fusionado con la proteína V de *Yersinia pestis*, junto con poly I:C, indujo altas frecuencias de células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ , además de anticuerpos IgA e IgG en vías respiratorias y pulmón (97). Por último, en nuestro laboratorio, Badillo *et al* (94), observó que hubo reducción en la carga viral en una infección con rotavirus después de la administración de un anticuerpo anti-DEC205 acoplado a la proteína VP6 de este virus.

De esta manera, el direccionamiento de antígenos hacia células presentadoras de antígeno utilizando DEC-205 como un modelo de vacunación contra influenza, representa una alternativa para generación de respuesta inmune heterosubtípica, la cual no ha sido explorada aún, por lo que el objetivo de este proyecto fue direccionar epítomos conservados de proteínas de virus influenza hacia DC, con el fin de lograr protección heterosubtípica en un modelo murino de infección *in vivo* por virus influenza.

HIPÓTESIS

El direccionamiento de epitopos conservados de células T y B de proteínas de IAV hacia células dendríticas por medio de un anticuerpo contra el receptor endocítico DEC-205 proporcionará protección heterosubtípica en un modelo murino de infección por el virus influenza.

OBJETIVO

Determinar si el direccionamiento de epitopos conservados de células T y B de proteínas de IAV hacia células dendríticas por medio de un anticuerpo contra el receptor endocítico DEC-205 administrado de manera s.c., confiere protección heterosubtípica en un modelo murino de infección *in vivo* por el virus influenza.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Reproducir un modelo de infección heterosubtípica por Virus Influenza en ratón BABL/c.
2. Elegir epitopos conservados de proteínas de Virus Influenza A que sean blancos de anticuerpos y células T CD4⁺.
3. Entrecruzar bioquímicamente anticuerpos anti-DEC-205 con péptidos sintetizados bioquímicamente, derivado de los epitopos elegidos.
4. Determinar si la inmunización s.c. con los anticuerpos anti-DEC-205 entrecruzados con los epítopos confieren protección en el modelo de infección murino.
5. Analizar mecanismos de protección específica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Animales de laboratorio

Los ratones BALB/c y C57BL6 fueron proporcionado por el Instituto de Biotecnología (IBT, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México). Para los procedimientos experimentales, los ratones fueron alojados tanto en las instalaciones del IBT, como de la facultad de Medicina (UAEM, Cuernavaca, Morelos, México) con ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) y provistos con alimento y agua *ad libitum*.

Células

Las células de riñón de perro Madin-Darby (MDCK; ATCC CCL34) se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina (GIBCO). Los hibridomas NLDC145 (rata anti-ratón DEC-205, IgG2a), III-10 (control de isotipo IgG2a de rata), GK1.5 (rata anti-CD4 de ratón, IgG2b; ATCC TIB 207), y M2-1C6-4R3 (ratón anti-M1 de IAV, IgG1, ATCC HB64), y las células CTLL2 se mantuvieron en medio RPMI, suplementado con 10% de FBS, 2mM de glutamina y 20 ug/mL de gentamicina (GIBCO). Los hibridomas NLDC145 e III-10 fueron amablemente donados por el grupo de Ralph Steinman (Laboratory of Cellular Physiology, The Rockefeller University, New York). Los hibridomas GK1.5 y M2-1C6-4R3 fueron amablemente donados por el grupo de Jonathan Yewdell (Laboratory of Viral Diseases, NIH, Washington DC). Las células con fenotipo de DC se derivaron de médula ósea de ratón en presencia de GM-CSF(Invitrogen) por 9-12 días, como se describió previamente (94).

Virus

Los virus influenza A/H1N1/New Caledonia/20/99 y A/H3N2/NT/60/68 fueron amablemente donados por Carlos Arias (IBT, UNAM), Jack Bennink y Jonathan Yewdell (Laboratory of Viral Immunology, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland), respectivamente. Los virus se expandieron *in vitro* en células MDCK, o en embriones de pollo de 10 días (Alpes, México) infectados e incubados por 48h a 34°C. Para infecciones *in vivo*, los virus se adaptaron a ratón por medio de 14 pases seriales en ratones BALB/c, como se describió anteriormente (119, 120). Los lisados celulares, líquido alantoideo y homogenados pulmonares infectados se alicuotaron y fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

Péptidos

Los péptidos derivados de secuencia de virus humano de M2 (aa 1-24; MSLLETVETPIRNEWGCRCNDSSD; M2e) (64), de un epítipo de célula B de HA de A/H1N1/New Caledonia/20/99 virus (aa 331-355; VTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEG; HA331-355; HAB)(121) y epítopos de célula CD4⁺ de HA de A/H3N2/Memphis/102/72 (aa 96-104; AELLVALENQHTIDL; HACD4)(122) y NP de A/H3N2/NT/60/68 (aa 182-205; VTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEG; NPCD4)(123) fueron sintetizados por EZbiolab (Carmel, CA).

Anticuerpos

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-DEC-205, control de isotipo de rata IgG2b, anti-CD4 y anti-M1 de influenza se cultivaron y purificaron como describió *Badillo-Godinez et al* (94). El anticuerpo policlonal de conejo hecho en el laboratorio (anti-OVA) también fue descrito anteriormente (94). Un anticuerpo policlonal anti-influenza se produjo inmunizando un conejo con una mezcla de IAV A/H1N1/New Caledonia/20/99 and A/H3N2/NT/60/68 (anti-FLU). El anticuerpo monoclonal anti-M2 14C2 (IgG1) se compró de ABCAM. Los anticuerpos secundarios policlonales anti rata IgG de conejo (Sigma), anticuerpos policlonales conjugados a peroxidasa (HRP) anti ratón IgG1

e IgG2 de conejo (Zymed), anti ratón IgG de cabra (Jackson Immuno Research) y anti conejo IgG de cabra (Dako) se usaron para diferentes procedimientos experimentales. Para citometría de flujo, el mAb anti-ratón CD11c (HL3)-biotina, streptavidina conjugada a APC o FITC y el anticuerpo policlonal anti-ratón IgG-FITC de cabra fueron adquiridos de Biolegend, el anticuerpo policlonal anti-rata-IgG-Alexa488 de cabra se adquirió de Life Technologies.

Métodos

Titulación de Virus

Las unidades formadoras de focos (ffu) se evaluaron en homogenados de pulmón infectados con IAV. Los homogenados se diluyeron serialmente quedando finalmente en medio DMEM conteniendo 1ug/mL de tripsina tratada con 1-(tosilamida-2-fenil) etil clorometil cetona (TPCK)(Sigma), y 100 µL de cada dilución se usó para infectar una monocapa de células MDCK en placas de 96 pozos por 1h a 37°C. Después de este tiempo, el medio de infección se reemplazó con medio fresco DMEM y se incubó por 16h a 37°C. Las células se fijaron con acetona 80% en PBS y se incubaron con anti-FLU Ab por 1h a 37°C. Las células se lavaron y se agregó el anticuerpo secundario policlonal cabra anti-conejo IgG-HRP, y se incubó por 1h a 37°C. Después de lavar, se agregó el sustrato (3-amino-9-etil carbazol en buffer acetatos 0.1M, Sigma), y después de 5 minutos a TA, las placas se lavaron con agua destilada. Los focos de infección se contaron en un microscopio de luz y se expresaron como ffu/mL. La DL₅₀ de los homogenados de pulmón en ratón se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Reed Muench (124).

Las unidades formadoras de placas (pfu) se evaluaron en líquido alantoideo infectado con IAV. Éste se diluyó en base 10 en medio DMEM con 1ug/mL de tripsina tratada con TPCK, y 1 mL de cada dilución se usó para infectar una monocapa de células MDCK en placas de 6 pozos por 2h a 37°C a

37°C. Después de este tiempo, el medio de infección se descartó y 3 mL de agar noble 0.5% (Difco) en medio DMEM suplementado con penicilina/streptomina y tripsina tratada con TPCK (1ug/mL) se agregó a las células. Después de 2-3 días de incubación a 37°C, se agregaron 1.5 mL de paraformaldehído 2% en PBS a cada pozo por 2h a TA. Después de lavar con PBS, las células fijadas se tiñeron con cristal violeta 1% en etanol por 5 min, se lavaron con agua destilada y las placas de infección se contaron en un microscopio invertido. Las placas de infección se expresaron como pfu/mL.

Entrecruzamiento químico de anticuerpos monoclonales con péptidos u OVA

Los anticuerpos monoclonales anti-DEC-205 y su control de isotipo se activaron individualmente con succinimidil-4-(N-maleidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC)(Pierce), mientras que los péptidos y OVA (Sigma) se activaron independientemente con reactivo de Traut (2-iminotiolano; Pierce). Después de este proceso, mAbs y antígenos se dializaron separadamente (con excepción de los péptidos debido a su pequeño peso molecular) y se mezclaron 1:1 (peso:peso) por dos días a 4°C. Después de este periodo, el antígeno no unido se removió pasándolo por un filtro para centrifuga con corte de 100 kDa (Amicon). Los conjugados resultantes fueron sujetos a SDS-PAGE, Western blot y slot-blot.

SDS-PAGE y Western blot

Para caracterizar los anticuerpos entrecruzados con los antígenos, los conjugados se resolvieron en geles de acrilamida 10-12% y se tiñeron con azul de coomasie o por tinción con plata. Para confirmar la especificidad de los conjugados, lisado de BMDC, células MA104 y el propio anti-DEC-205 purificado se resolvieron en condiciones reductoras (144mM de 2-mercaptoetanol; 2-ME) en un gel de acrilamida al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 1h a 200V, usando un mini trans blot (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con buffer bloqueador (5% de leche libre de grasa y 0.05% de Tween-20 en PBS) por 1h a TA. Después de lavar con Tween-20 0.05% en PBS, las

membranas se incubaron con el anticuerpo anti-DEC-205 purificado (10 ug/mL) toda la noche (ON) a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó y se incubó con un anticuerpo de conejo anti-rata (1:1000 en buffer de bloqueo) por 1h a 37°C, seguido del anticuerpo secundario de cabra-anti conejo-HRP (1:8000 en buffer de bloqueo). La membrana se lavó y se adicionaron 300 µL de luminol + 300 µL de solución oxidativa (Perkin Elmer), exponiendo la membrana a una película de exposición fotográfica (SO-170 Flex GP Kodak) por 5 minutos en la oscuridad.

Para confirmar el entrecruzamiento de α -DEC-205 y control de isotipo con el péptido M2e, se realizó un gel con un tercio de acrilamida 15% (abajo) + dos tercios de acrilamida 10% (arriba), esto para separar los anticuerpos conjugados (de alto peso molecular) con el péptido M2e (muy bajo peso molecular, 2.4 kDa). Las muestras se resolvieron bajo condiciones reductoras y no reductoras (2-ME) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon como se describió en el procedimiento anteriormente descrito. Las membranas se trataron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgGs de rata o con un anticuerpo anti-M2e (14C2) diluido en 1:1000 en buffer de bloqueo. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos secundarios (Ab policlonal de cabra anti-IgG de conejo-HRP ó cabra anti-IgG1 de ratón-HRP, respectivamente diluidos en buffer de bloqueo 1:2500) por 1h a 37°C. Después de lavar se agregó el luminol a cada membrana y se capturó la señal en el equipo Odyssey Fc (LI-COR).

Slot-blot

Para calcular la cantidad de péptido M2e unido a los anticuerpos (α -DEC-205:M2e and isotype:M2e) se realizó un ensayo de slot blot. Diluciones seriales de péptidos M2e y HA₃₃₁₋₃₅₅ (control negativo), así como de los conjugados, se inmovilizaron en una membrana de nitrocelulosa usando el equipo Hybri-Slot Manifold (Biotra). Las membranas se trataron como en el procedimiento de western blot descrito anteriormente, usando el mAb 14C2 como anticuerpo primario, y el anticuerpo policlonal de

cabra anti-IgG1 de ratón-HRP como anticuerpo secundario. La cantidad de M2e de péptido unido a los conjugados se extrapola de una curva estándar construida con la señal emitida por péptido libre M2e.

Inmunización y Reto

Grupos de 4-6 ratones se inocularon s.c. tres veces, cada 21 días con los anticuerpos conjugados con los péptidos ó con los péptidos libres, todos los grupos en presencia de 50 ug/ratón de poly I:C (Amershan BioSciences) como adyuvante. Antes de cada inmunización (días 0, 21 y 42), los ratones fueron sangrados para obtener suero y analizar los niveles de anticuerpos. Dos semanas después de la tercera inmunización (día 57), los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Soflorane Vet, Pisa Laboratory) y retados i.n. con 50 μ L de PBS conteniendo 30LD₅₀ de IAV A/H3N2/NT/60/68 ó A/H1N1/New Caledonia/20/99. La morbilidad (pérdida de peso) y la mortalidad se monitoreó cada 24 horas por 10 días. Por razones éticas, los ratones que perdieron más del 25% de su peso inicial fueron sacrificados y se consideró como una muerte relacionada a la infección por IAV.

Eliminación de células T CD4⁺

Para evaluar el papel de las células T CD4⁺ efectoras en la protección en contra del reto letal por IAV, ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e fueron inoculados i.p. con 2.5 mg de anticuerpo purificado anti-CD4 (GK1.5) en los días -3, 0 y +3 con respecto al día del reto con IAV. Este tratamiento induce la eliminación de más del 99% de las células T CD4⁺ en el bazo determinado por citometría de flujo. La mortalidad de los ratones se evaluó como se describió anteriormente.

Transferencia pasiva de suero

Ratones naive se transfirieron con 350 μ L de un pool de sueros obtenidos de ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e (post tercera inmunización) ó el mismo volumen de un pool de suero obtenido de

ratones inmunizados con PBS + adyuvante (mock será). La mortalidad de los ratones se evaluó como se describió anteriormente.

Detección de anticuerpos séricos específicos de M2e o HAB

Placas de 96 pozos de alta afinidad (Costar) se cargaron con 400 ng/pozo de péptido sintético M2e o HAB diluidos en buffer de carbonatos 0.1M (ph 9.6), ON a 4°C. Después, los pozos se lavaron con buffer de bloqueo (leche libre de grasa 5% en PBS 0.05% de Tween-20) por 2h a TA. Después, un pool de suero de ratones inmunizados se diluyó 1:200 para motivos de tamizaje de anticuerpos, o 1:500 a 1:128,000 con propósitos de titulación, en buffer de bloqueo y 50 µL de cada dilución se añadió a cada pozo y se incubó por 2h a 37°C. Las placas se lavaron con PBS/Tween-20 0.05% y se agregaron en 50 µL de buffer de bloqueo el anticuerpo secundario: anti-raton IgG-HRP (1:2500), anti-ratón IgG1-HRP (1:500) o anti ratón IgG2a (1:500), y se incubaron por 1 hora a 37°C. Después de lavar, se agregaron 50 µL del sustrato (o-fenilendiamina; Sigma) y se incubó por 15 minutos a TA. La reacción se paró con H₂SO₄ 2M y las placas se leyeron a 492 nm en un espectrofotómetro para placas de 96 pozos (BIOTEK, Instruments).

Ensayo de neutralización de IAV

Los niveles de anticuerpos neutralizantes en contra de IAV en suero experimental se analizaron en un ensayo de neutralización de reducción de antígeno basado en ELISA (NELISA). Un pool de suero de ratones inmunizados, suero de conejo policlonal anti-FLU ó suero de raton preimmune se diluyeron serialmente (base 2) en medio DMEM en placas de 96 pozos, y 50 µL de cada dilución se mezcló con 100 pfu de IAV H1N1/New Caledonia/20/99 (líquido alantoideo). Después de 1 h de incubación a 37°C, la mezcla se añadió a una monocapa de células MDCK en placas de 96 pozos, y se incubó por 1h a 37°C. Después de este tiempo, el inculo se reemplazó con medio DMEM fresco con 1ug/mL de tripsina tratada con TPCK y se incubó por 18-20h a 37°C. Las placas se congelaron y descongelaron

tres veces para liberar el antígeno viral, y la carga de antígeno viral se determinó por un ensayo de ELISA. Para esto, placas de 96 pozos se cargaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-FLU (1:8000) en PBS ON a 4°C. Los pozos se bloquearon con buffer de bloqueo por 2h a TA y 50 µL de los lisados celulares se añadieron y se incubaron por 1h a 37°C. Las placas se lavaron, y se añadió 50 µL de anticuerpo anti-M1 (HB64) en buffer de bloqueo (1:100) y se incubó por 1h a 37°C. Finalmente, 50 µL de anticuerpo de conejo anti-ratón IgG1-HRP (1:500) se diluyó en buffer de bloqueo y se incubó por 1h a 37°C. La adición del sustrato y la lectura de placa se realizó de acuerdo al ensayo de ELISA antes descrito.

Ensayo de proliferación de células CTLL2 (dependientes de IL-2) con sobrenadantes de células de bazo de ratones inmunizados

Quinientos mil esplenocitos de ratones inmunizados fueron estimulados por 96 horas en 500 µL de RPMI con suero con 5ug de péptido (según cada caso), como controles positivos líquido alantoideo infectado con IAV previamente irradiado con luz ultravioleta por 15 minutos ó 5 ug de concavalina A (CoA), y como controles negativos líquido alantoideo sin infectar irradiado ó RPMI solo. Después de la incubación se recuperó el sobrenadante y se añadió 50 µL de cada uno a una placa de 96 pozos, a la cual se agregó otro volumen igual de RPMI conteniendo 5×10^4 células CTLL2 que previamente fueron privadas de IL-2 por dos horas. Se incubaron a 37°C por 22 horas y después se agregaron 20 µL de MTT (5 ug/mL en PBS) y se incubaron 5 horas a 37°C. Posteriormente se agregaron a cada pozo 100 µL de SDS/HCl 0.01M, y se dejó toda la noche a 37°C. Se resuspendió y se leyó la placa a 570 nm.

Proliferación de células de bazo de ratones inmunizados estimuladas con los epitopos por medio de la tinción con CFSE

Quinientos mil esplenocitos de ratones inmunizados se tiñeron con carboxifluoresceína (CFSE, 5 μ M) y se estimularon por 96 horas en 500 mL de RPMI con 5 μ g de péptido (según cada caso), como controles positivos líquido alantoideo infectado con IAV previamente irradiado con luz ultravioleta por 15 minutos ó 5 μ g de concavalina A (CoA), y como controles negativos líquido alantoideo sin infectar irradiado ó RPMI solo. Posterior al tiempo de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2%, las cuales permanecieron a 4°C hasta que se analizó por citometría de flujo.

Citometría de flujo

BMDC se colectaron y se lavaron dos veces con binding buffer (BB;0.01% de azida de sodio, 2mM de EDTA, y 2% de FBS) más 2% de suero de conejo (para bloquear receptores Fc), se resuspendieron en el mismo buffer y se incubaron por 30 min a 4°C. Las células se lavaron con BB y se resuspendieron en 100 μ L de BB conteniendo los mAbs anti-CD11c-biotina y anti-DEC-205, y se incubaron por 20 min a 4°C. Después de lavar, las células se resuspendieron en 100 μ L de BB conteniendo streptavidina-APB, y cabra anti-rata IgG-alexa488, y se incubaron por otros 20 min a 4°C. Finalmente, las células se lavaron, se fijaron con 100 μ L de paraformaldehído 2% a TA por 20 min, y 10,000 células por muestra se adquirieron y analizaron con el citómetro FACS Aria-II (Beckton Dickinson). El análisis (gating) se realizó con el software Flow Jo (Tree Star, Inc). Cuando los conjugados se usaron, se usaron los anticuerpos de ratón anti-M2e o anti-OVA seguidos del anticuerpo de cabra anti-ratón IgG-FITC.

Análisis Estadístico

Las pruebas estadísticas ANOVA de una vía, comparaciones múltiples de Dunnett y la prueba de Fisher se realizaron usando Graph Pad Prism versión 6.0 (Graph Pad, Software Inc, La Jolla CA).

RESULTADOS

Desarrollo de un modelo murino de infección por Virus Influenza A

Los modelos animales de laboratorio son muy útiles para la evaluación preclínica de potenciales vacunas y compuestos antivirales. En ellos se puede investigar la seguridad de dicha vacuna o compuesto, y su eficacia en prevenir o moderar la infección. En este sentido, el ratón es el modelo más usado en la investigación con el virus influenza, debido a su practicidad, tamaño, costo, requerimientos para su mantenimiento, y disponibilidad de reactivos específicos (3). Aunque el ratón no es naturalmente susceptible a la infección por IAV, muchas cepas pueden ser adaptadas para infectar a esta especie por medio de pases consecutivos del virus en pulmón. El proceso de adaptación a ratón resulta en la ganancia de mutaciones en múltiples genes, principalmente en el gen que codifica a la HA, el cual es el principal factor de virulencia debido a sus funciones de unión al receptor y fusión de las membranas viral y endosomal (119). Con esto, se generan variantes genéticas con la capacidad aumentada de reconocimiento de receptores virales en ratón y por lo tanto con la capacidad de replicarse en dicho hospedero.

En el presente proyecto se desarrolló un modelo murino de infección por IAV con el objetivo de evaluar protección heterosubtípica en el modelo de vacunación que se propuso para este trabajo. Para ello, las cepas A/H1N1/New Caledonia/99 y A/H3N2/NT/60/68 fueron adaptadas en ratones hembras de la cepa BALB/c realizando catorce pases en pulmón para cada uno, como se explica en materiales y métodos. En el último pase (pase 14), se infectaron 20 ratones, y se realizó un pool de lisado pulmonar que se recuperó a las 72 horas de infección, el cual fue almacenado a -80°C hasta su uso. Los lisados pulmonares fueron titulados por ensayo de focos de infección y se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀)

infectando i.n. grupos de ratones con diversas diluciones de cada lisado. La **figura 10** muestra que ambos lisados pulmonares son capaces de inducir morbilidad (pérdida de peso) y mortalidad en ratones de la cepa BALB/c. La siguiente tabla resume los datos de titulación para cada lisado pulmonar.

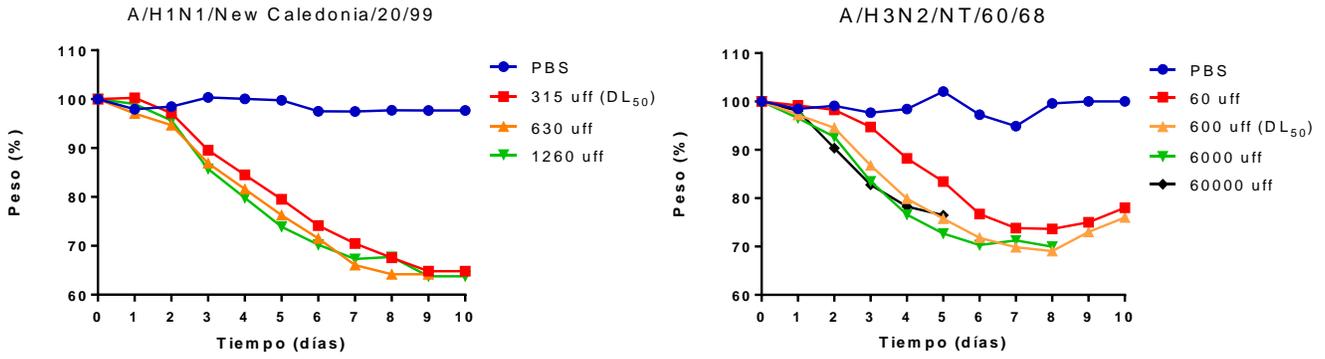
Tabla 2. Titulación de lisado pulmonar de Virus Influenza A adaptados a ratón

	Título (uff/mL)	DL ₅₀
A/H1N1/New Caledonia/99	6.3×10^5	315 uff
A/H3N2/NT/60/68	1.2×10^6	600 uff

Epítomos conservados de proteínas de Virus Influenza A blancos de anticuerpos y células T CD4⁺

Los candidatos al desarrollo de una vacuna universal son el ectodominio de la proteína M2, el tallo de la hemaglutinina y epítomos de células T de proteínas conservadas, como NP ó M1. El objetivo del presente proyecto fue seleccionar epítomos lineales conservados provenientes de estos dominios para posteriormente sintetizar péptidos derivados de ellos y luego ser acoplados bioquímicamente al anticuerpo α -DEC-205. Después de realizarse una exhaustiva revisión bibliográfica, seleccionamos dos epítomos de células CD4⁺ (uno de NP y otro de HA), y dos epítomos duales, que contienen determinantes antigénicos, tanto de células B como de células CD4⁺ (ectodominio de la proteína M2, M2e; epítomo de célula B del tallo de HA; HAB). La **tabla 3** muestra las secuencias para cada epítomo.

A



B

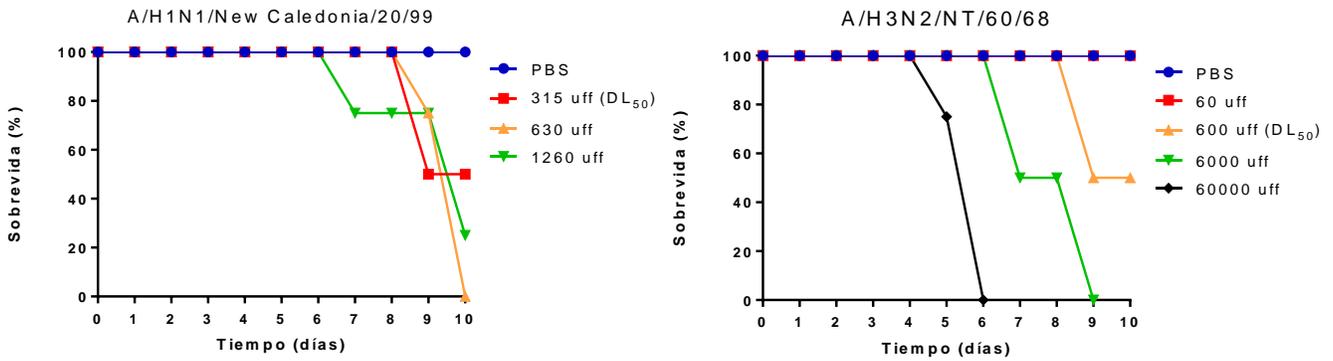


Figura 10. Determinación de dosis letal 50 para los lisados pulmonares infectados con Virus Influenza A. Grupos de 4 ratones se infectaron vía i.n. con diluciones de los lisados pulmonares del pase 14 infectados con A/H1N1/New Caledonia o A/H3N2/NT/60/68. La DL₅₀ se indica. Se muestra el comportamiento como pérdida de peso (A) y Sobrevida (B) para cada grupo experimental.

Tabla 3. Epítomos conservados de proteínas de Virus Influenza A

Epítopo		Secuencia	Restricción	Mecanismo de protección
M2₁₋₂₄ B y CD4	M2e	MSLLTEV ETPIRNEWGCR CNDSSD Epítopo CD4	CD4 (H-2 ^d I-A ^d)	Anticuerpos anti-M2e: CCDA, FDA. Células Th17 que atraen neutrófilos después de la infección, cooperación en producción de anticuerpos(125, 126).
HA₃₂₂₋₃₅₆ B y CD4	HAB	VTGLRNIPSIQSR GLFGAIAGFIEG Epítopo CD4	CD4 (H-2 ^d I-E ^d)	Interfiere con la fusión de las membranas viral y endosomal, cooperación en producción de anticuerpos (121, 127)
NP₁₈₂₋₂₀₅ CD4	NPCD4	AVKGVGTMVMELIRMIKRGINDRN	H-2 ^d I-A ^d	Cooperación con células B y T(123)
HA₉₆₋₁₀₄ CD4	HACD4	AELLVALENQHTIDL	H-2 ^d I-A ^d	Cooperación con células B y T(122)

Producción de anticuerpos α -DEC-205 entrecruzados bioquímicamente con epítopos conservados de proteínas de virus influenza

Purificación del anticuerpo α -DEC-205

NLDC145 es un hibridoma de rata que produce un anticuerpo monoclonal de la clase IgG2a con selectividad para células dendríticas murinas. Reacciona fuertemente con células de Langerhans en la piel en áreas de células T de órganos linfoides periféricos y en poblaciones derivadas de progenitores de médula ósea tratados con GM-CSF(128). Este hibridoma fue producido por Kraal *et al* en 1986, al inmunizar ratas Wistar con estroma de nódulos linfoides de ratón emulsificados con adyuvante completo de Freund para posteriormente fusionar células de bazo con células de mieloma SP2/0. (129). Posteriormente se determinó que era específico de una glicoproteína integral de membrana de 205 kDa (DEC-205), receptor presente principalmente en DC, que promueve la internalización y hace más eficiente la presentación de antígeno hacia células T en nódulos linfoides periféricos, por lo que está siendo investigado en la actualidad como un posible candidato para el desarrollo de vacunas basadas en células dendríticas (130).

El anticuerpo α -DEC-205 se purificó mediante el cultivo del hibridoma NLDC145 obteniéndose 14 mg en un volumen de 14 mL (concentración 1 mg/mL). Para comprobar la funcionalidad de este anticuerpo, se derivaron células dendríticas de médula ósea (BMDC) de ratón por medio del estímulo con GM-CSF y se tiñeron con los anticuerpos α -DEC-205 y α -CD11c-biotina, seguido de un anticuerpo anti IgGs de rata marcado con Alexa488 y streptavidina-APC. Al realizar el análisis por citometría de flujo se observó que el anticuerpo α -DEC-205 reconoce el 22.4% de las células teñidas, que representa el 29% de las células positivas a CD11c, marcador de linaje de células dendríticas. Por otro lado, el anticuerpo α -DEC-205 reconoció a su ligando en un ensayo de Western blot cuando se

corrió el lisado de BMDCs. Esto se evidenció por la aparición de una banda entre la señal de las bandas de 100 y 250 kDa del marcador de peso molecular, sugiriendo que es DEC-205 (205kDa) (**Figura 11**). En el mismo ensayo se usó como control del anticuerpo secundario (anti-IgG de rata-HRP) el propio α -DEC-205, apareciendo en la imagen dos bandas de aproximadamente 50 y 25 kDa, tratándose de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que fueron reducidas por el tratamiento con 2-ME. Estos resultados concuerdan con los datos reportados por Badillo-et al (94) e indican que el anticuerpo purificado es funcional.

Entrecruzamiento del anticuerpo α -DEC-205 con péptidos derivados de epitopos conservados de proteínas de Virus Influenza

Una vez purificado el anticuerpo α -DEC-205 se procedió a conjugarlo químicamente con los péptidos sintetizados a partir de la secuencia de los epitopos conservados de proteínas de IAV previamente elegidas, y OVA como antígeno irrelevante. Para ello se usaron dos entrecruzadores, el reactivo de Traut, el cual reacciona con grupos amino presentes en los péptidos, proveyendo un grupo sulfhidrilo (-SH), que al ponerse en contacto con el anticuerpo previamente tratado con el entrecruzador sulfo-SMCC, permite formar un enlace tioetér entre péptido y anticuerpo. Como se aprecia en la **figura 12** los anticuerpos entrecruzados presentan un aumento en su peso molecular con respecto al anticuerpo sin entrecruzar, indicando que los péptidos se conjugaron eficientemente al anticuerpo. Aunque no se muestran aquí, los péptidos también fueron entrecruzados con el anticuerpo control de isotipo III-10.

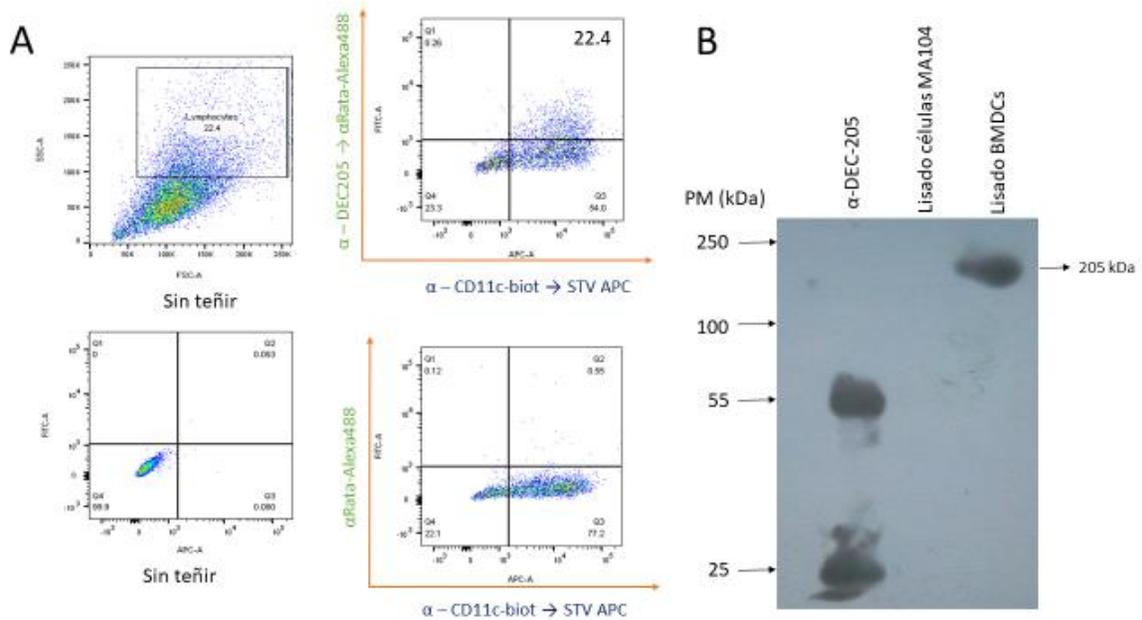


Figura 11. Detección de DEC-205 por anticuerpo purificado del hibridoma NLDC145. (A) Células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) fueron teñidas con los anticuerpos α -DEC-205 y α -CD11c-biotina, seguidos de α -Rata-Alexa488 y streptavidina APC. (B) Western blot con lisado de BMDC revelado con el anticuerpo α -DEC-205, seguido de un anticuerpo α -IgGs de rata-HRP. Como control negativo se corrió un lisado de células MA104, y como control del anticuerpo α -Rata se utilizó el propio anticuerpo α -DEC-205. Todas las muestras fueron hervidas y tratadas con 2-ME.



Figura 12. Entrecruzamiento químico del anticuerpo α -DEC-205 con péptidos conservados de proteínas de IAV. Se realizó un gel de acrilamida al 12% en donde se corrieron los anticuerpos entrecruzados bioquímicamente con los péptidos. Posterior a la corrida electroforética el gel se tiñó con azul de coomassie. En la imagen se observa un aumento en el peso molecular, con respecto al peso del anticuerpo sin entrecruzar, indicando la presencia de péptidos unidos.

Inmunogenicidad de los anticuerpos conjugados (prueba de concepto)

Una vez que se conjugaron los anticuerpos α -DEC-205 y el control de isotipo con cada péptido u OVA como antígeno irrelevante, se procedió a evaluar su inmunogenicidad. En un primer análisis exploratorio se realizó una serie de experimentos en donde grupos de ratones hembra BALB/c fueron inmunizados vía s.c. tres veces (cada 21 días) con 10 ug/ratón total de cada anticuerpo conjugado ó 5ug /ratón de péptido libre, todos en presencia de 50 ug de poly I:C como adyuvante en PBS. Previo a cada inmunización, los ratones fueron sangrados para el análisis de la respuesta de anticuerpos, y posterior a la última inmunización retados con 30LD₅₀ de virus H3N2 como muestra la **figura 13**. Es importante mencionar que para estos experimentos preeliminares no se determinó la cantidad exacta de péptido que estaba unido a cada anticuerpo, y se consideraron 10 ug de anticuerpo entrecruzado total.

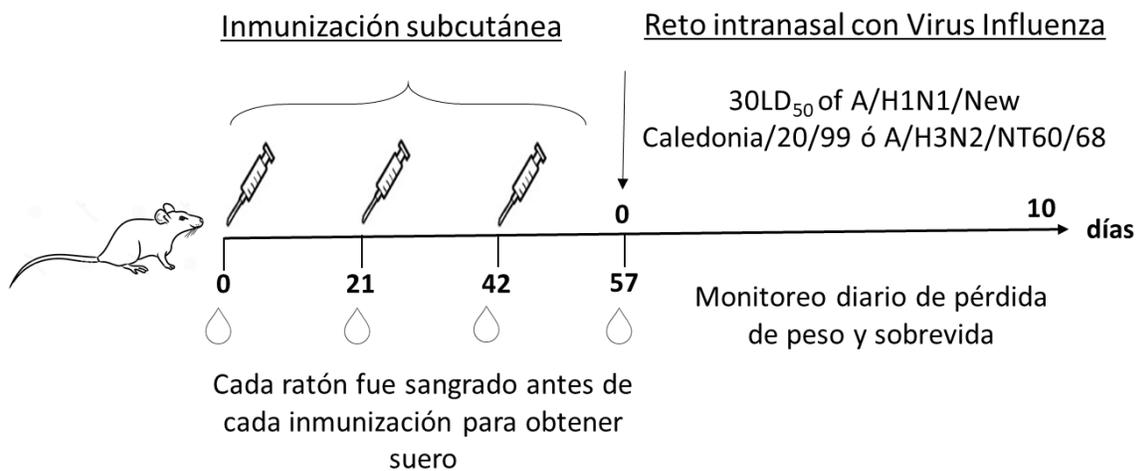


Figura 13. Esquema de inmunización de anticuerpos entrecruzados con péptidos derivados de epítopos conservados de proteínas de IAV. Grupos de ratones BALB/c fueron administrados vía s.c. con los anticuerpos entrecruzados, los péptidos o PBS como control, todos en presencia de 50 ug de poly I:C, como adyuvante en los días 0, 21 y 42. Previo a cada inmunización se tomó una muestra de sangre para evaluar la respuesta humoral específica. En el día 57, los ratones fueron retados con 30LD₅₀ i.n de Virus Influenza A H1N1/New Caledonia/20/99 ó H3N2/NT/60/68 y se monitoreó la pérdida de peso y la sobrevivencia diariamente.

Análisis de respuesta de anticuerpos

Con el objetivo de evaluar la respuesta de anticuerpos séricos cuando fueron direccionados los epítomos M2e y HAB a DEC-205, se realizaron ensayos de ELISA directo, en los que se cargaron 400 ng de cada péptido por pozo en placas de 96 pozos, y posteriormente se agregó un pool de sueros correspondiente a cada grupo experimental. El anticuerpo secundario usado fue un cabra anti-IgGs de ratón conjugado con peroxidasa. La **figura 14** muestra que el direccionamiento hacia DEC-205 del epítomo M2e incrementa de manera importante la respuesta de anticuerpos desde la segunda inmunización, comparado con el tratamiento con péptido libre o isotipo:M2e, en los cuales aumenta hasta después de la tercera inmunización, pero sin alcanzar los niveles detectados con α -DEC-205:M2e. En cambio, con el péptido HAB la producción de anticuerpos es baja y no parece influir cuando es direccionado hacia DEC-205. Estos resultados demuestran que la respuesta humoral en ratones BALB/c hacia el epítomo M2e se eficientiza cuando el péptido es direccionado hacia DEC-205, pero no es el caso con el péptido HAB.

Evaluación de protección ante el reto con IAV

Después de 15 días de la última inmunización con cada tratamiento, los ratones fueron retados i.n. con 30LD₅₀ de virus influenza A/H3N2/NT/60/68 con el objetivo de analizar la protección que induce cada uno de ellos. La **figura 15** resume los resultados de sobrevivencia para todos los grupos experimentales en esta serie de experimentos preliminares. En ella se puede observar que el grupo que recibió α -DEC-205:M2e incrementa al doble la sobrevivencia (66.6%) con respecto al grupo que fue administrado con péptido M2e libre (33.3%) o los grupos control α -DEC:OVA o PBS (0%).

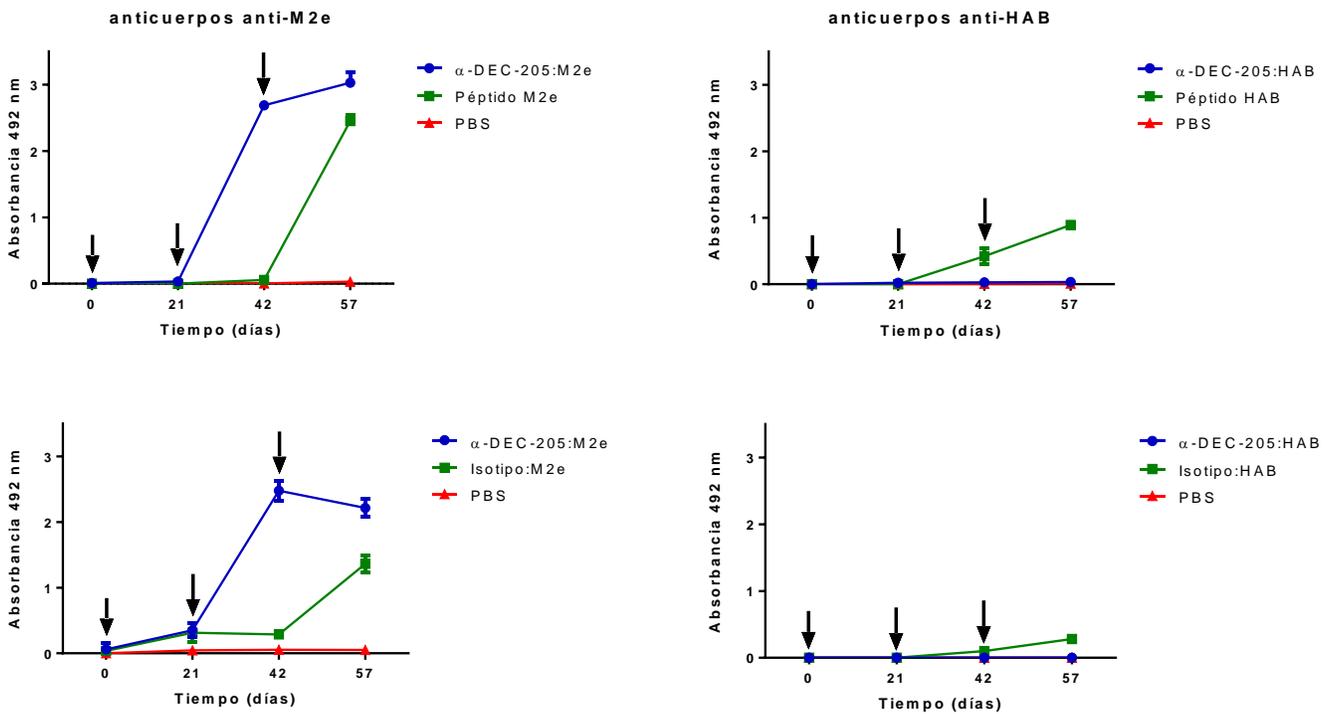


Figura 14. Cinética de anticuerpos anti-M2e y anti-HAB en ratones inmunizados. Seis ratones por grupo fueron inmunizados siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Se realizó un pool de suero para cada grupo experimental (1:200 en PBS) y fueron evaluados por un ensayo de ELISA directo usando los péptidos M2e y HAB como antígeno y un anticuerpo de cabra anti-IgGs de ratón-HRP como anticuerpo secundario. Se muestran cuatro experimentos representativos en donde se compara la eficiencia del direccionamiento de antígeno con los grupos control de péptido libre o isotipo entrecruzado con péptido.

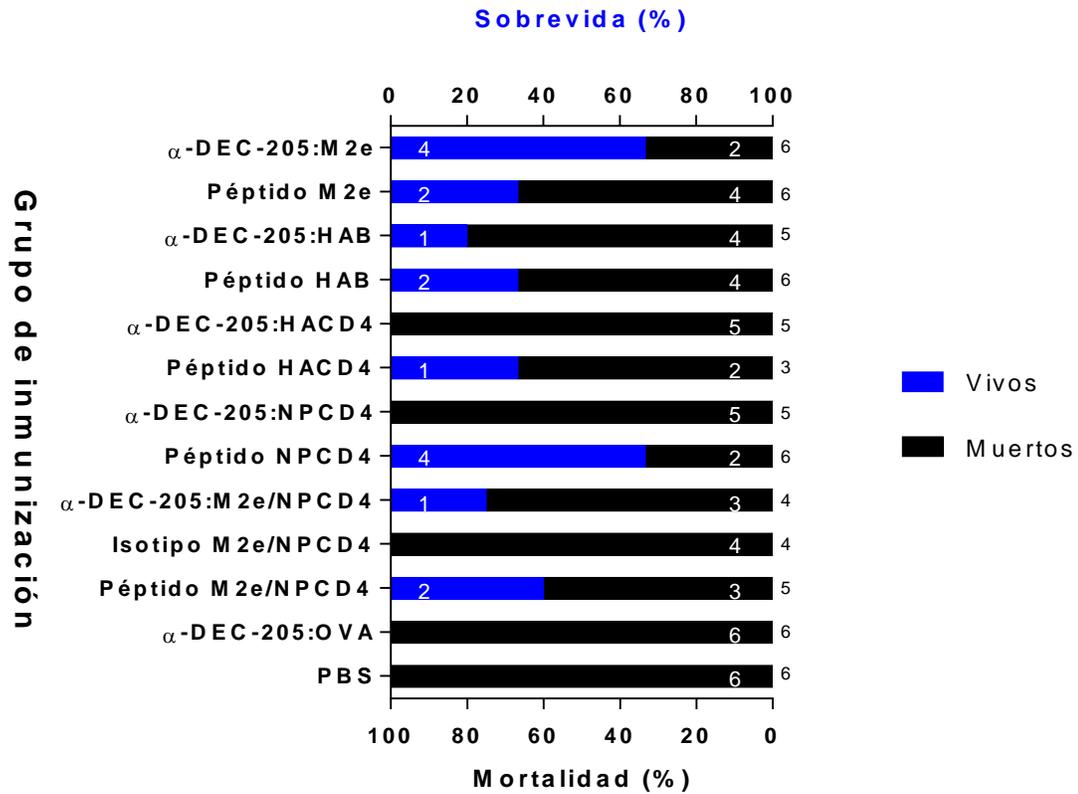


Figura 15. Sobrevida de ratones vacunados con anticuerpos conjugados con péptidos conservados de proteínas de Virus Influenza. 3-6 ratones por grupo fueron inmunizados con los anticuerpos conjugados y retados con 30DL₅₀ siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. La gráfica muestra la supervivencia total de cada grupo experimental, representado en barras normalizadas al 100%. La supervivencia se muestra en barras azules y la mortalidad en barras negras. El número de ratones vivos y muertos se describe en cada barra con números blancos. El número total de ratones usados en cada grupo se muestra arriba de cada barra.

Por otro lado, los grupos experimentales que fueron administrados con péptidos derivados de células T CD4⁺ (HACD4 y NPCD4), por si mismos indujeron un aumento de sobrevivencia con respecto a los grupos control del 33.3% y 66.6% respectivamente. Sin embargo, al direccionarse estos epítomos hacia DEC-205 esta protección se perdió resultando en una mortalidad del 100% para ambos grupos experimentales (α -DEC-205:HACD4 y α -DEC-205:NPCD4).

De manera relevante, cuando fueron direccionado de manera conjunta los epítomos M2e y NPCD4 hacia DEC-205 (α -DEC-205:M2e/NPCD4; 10 ug de α -DEC-205:M2e + 10 ug de α -DEC-205:NPCD4), se muestra una disminución en la protección que había mostrado el grupo α -DEC-205:M2e (de 66.6 a 25%), mientras que la administración de péptidos libres M2e y NPCD4 proporcionaron un aumento de la sobrevivencia del 40%, el cual es muy similar a lo que fue encontrado con la administración del péptido M2e, pero menor al que fue mostrado con péptido NPCD4. Estos resultados preliminares sugieren que el direccionamiento de M2e hacia DEC-205, el cual contiene epítomos tanto de células T CD4⁺ como de células B, incrementa la sobrevivencia ante un reto con IAV, mientras que cuando se direccionan los epítomos de células T CD4⁺ (NPCD4 y HACD4) parece suprimirse la protección que los péptidos NPCD4 y HACD4 ofrecen.

Estimulación antígeno específica en células de bazo de ratones vacunados

Una interrogante que surgió de los experimentos anteriores cuando los epitopos de células T CD4⁺ fueron direccionados hacia DEC-205, fue que, al no tener control de cuanto péptido se estaba entrecruzando con el anticuerpo, y por ende no se sabía cuanto antígeno estaba siendo direccionado, probablemente estaba siendo insuficiente para lograr el efecto deseado al ser direccionados hacia DEC-205, y debido a esto no habían tenido efecto protector, como si lo tuvieron los péptidos para células T CD4⁺ cuando los ratones se vacunaron con una cantidad conocida de péptido libre (5ug/ratón).

Para abordar lo anterior se decidió hacer un experimento para evaluar la producción de IL-2 en células de bazo estimuladas con epitopos CD4 recuperadas de ratones inmunizados con α -DEC-205:NP4, isotipo:NP4, péptido NP4 y PBS, bajo el esquema de inmunización antes mencionado. Dado que la IL-2 es una citocina que se secreta en grandes cantidades por células T CD4⁺ después de su activación (131), un aumento en la producción de ésta, sugiere que si había más células T CD4⁺ específicas, muy probablemente por la generación de memoria por el efecto de la vacunación. El ensayo de producción de IL-2 empleado se basa en el cultivo de células CTLL-2 (dependientes de IL-2) con los sobrenadantes procedentes de un previo cultivo de células de bazo de los ratones vacunados estimulados con el péptido. Como controles positivos de proliferación se estimularon los esplenocitos con líquido alantoideo infectado con virus H1N1 (para ratones inmunizados e infectados) y concavalina A. De esta manera, la proliferación de las células CTLL-2 (medida por ensayo de MTT) indica de manera indirecta la cantidad de IL-2 que fue secretada por las células de bazo después de la estimulación.

La **figura 16-A** muestra los resultados de este ensayo, en donde se observa un incremento en la proliferación células CTLL2 (medido por absorbancia) cuando el péptido NPCD4 fue direccionado hacia DEC-205, con respecto a cuando se inmunizó con péptido NPCD4 o isotipo:NPCD4, los cuales alcanzan niveles basales de absorbancia, ya que son similares a los obtenidos con el grupo que fue inmunizado con PBS. Lo que sugiere que cuando el epítipo NPCD4 fue direccionado hacia DEC-205 había más células T CD4⁺ específicas que se reflejó con un aumento en la producción de IL-2, que a su vez indujo la proliferación de células CTLL2 *in vitro*.

Sin embargo, los niveles de absorbancia detectados en este experimento fueron muy bajos, por lo que decidimos realizar otro ensayo infectando con una dosis subletal de virus influenza H3N2 antes de recuperar las células de bazo, con el objetivo de amplificar las células T CD4⁺ específicas, y así obtener un aumento en la señal de absorbancia. Para este ensayo, los ratones fueron inmunizados con α -DEC-205:HACD4, isotipo:HACD4, péptido HACD4, α -DEC-205:OVA y PBS; y retados 15 días después con A/H3N2/NT/60/68. Al día 8 post-infección, se aislaron las células de bazo y se procedió con el ensayo de IL-2 antes descrito. La **figura 16-B** muestra que la intensidad de absorbancia se aumentó con el reto previo con IAV, y también sugiere que había más células específicas para el epítipo HACD4 cuando éste fue direccionado, debido a un incremento en la proliferación de células CTLL-2 comparado con los grupos control.

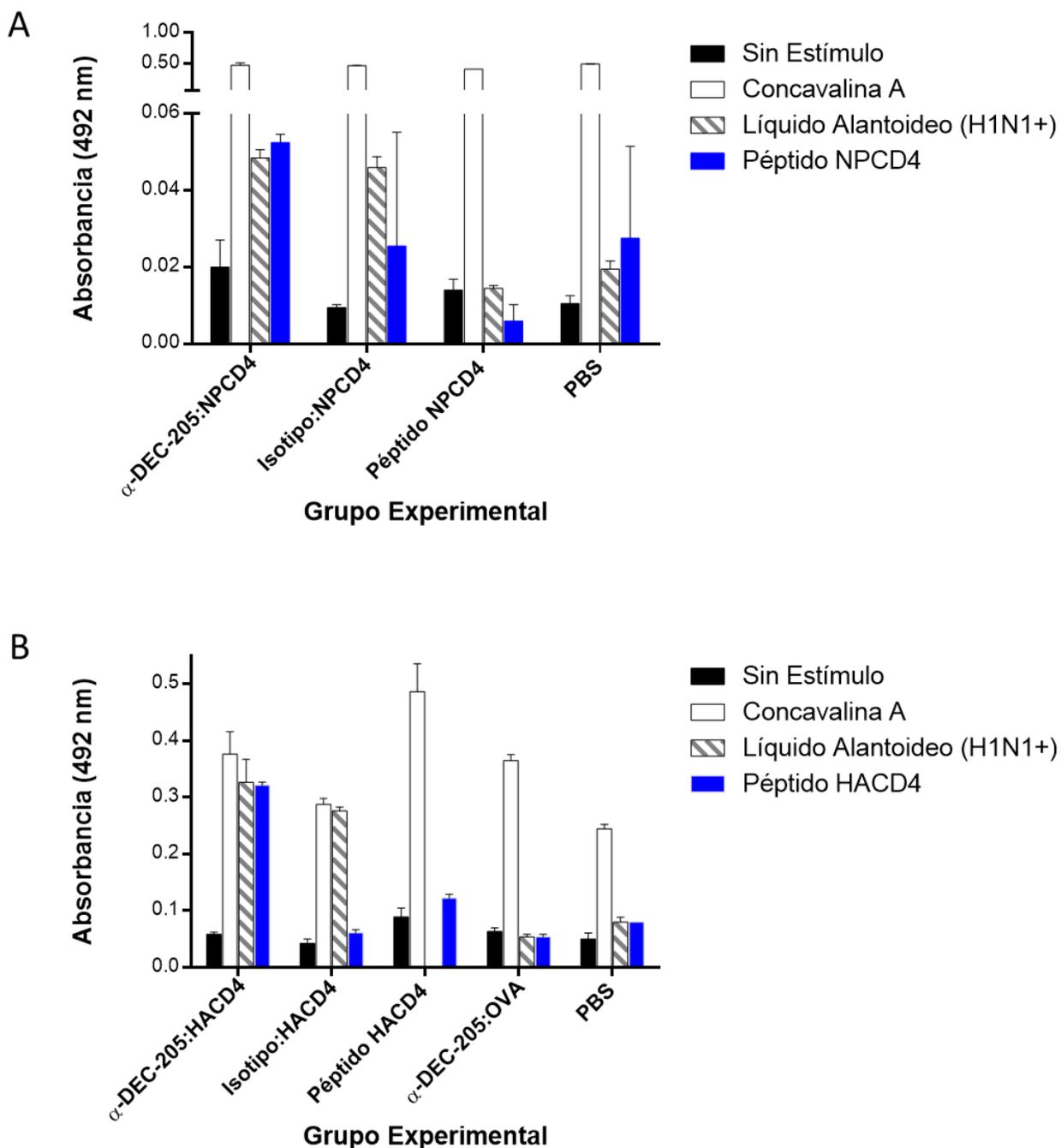


Figura 16. Proliferación de células CTLL2 (dependientes de IL-2) con sobrenadantes de células de bazo de ratones inmunizados con anticuerpos conjugados. Se realizó un pool de células de bazo con dos ratones por cada grupo experimental y se estimularon por 96 horas con los epitopos NPCD4 (A); 15 días después de la tercera inmunización o con HACD4 (B) 8 d.p.i.; reto subletal H3N2. Como controles positivos se usaron líquido alantoideo infectado con virus H1N1 irradiado y concavalina A. Después de la estimulación se recuperaron los sobrenadantes y se usaron como medio de cultivo para células CTLL2 por 22 horas a 37°C. Posteriormente se analizó la proliferación por el ensayo de MTT. La imagen es representativa de un experimento.

Una técnica que permite analizar la proliferación específica de antígeno es la tinción con carboxifluoresceína (CFSE), la cual se une moléculas en el citoplasma de los linfocitos y una vez que éstos comienzan a proliferar, la CFSE se diluye conforme las células se dividen. Es decir, una disminución en la fluorescencia emitida por el CFSE es consecuencia de la proliferación específica en respuesta al antígeno (132). Con el objetivo de analizar la proliferación específica de antígeno en células de bazo de ratones vacunados y retados de manera idéntica al experimento antes descrito, los esplenocitos (8 d.p.i) se tiñeron con CFSE y se estimularon con el péptido HACD4, con líquido alantoideo infectado con A/H1N1/New Caledonia/20/99 como control positivo de proliferación y como control negativo se usaron células sin estimular. Después de 96 horas, las células se analizaron por citometría de flujo. Como lo muestra la **figura 17**, Las células de bazo del ratón del grupo α -DEC205:HACD4 proliferan casi un 16%, que se hace evidente por la disminución de fluorescencia comparado con las células que no recibieron estímulo. Esta respuesta es similar a lo que se obtiene cuando las células son estimuladas con líquido alantoideo infectado con virus influenza H1N1, la cual solamente se observa en este grupo experimental (α -DEC205:HACD4) y correlaciona con la cantidad de IL-2 que secretan estas células en comparación con los grupos controles.

De manera similar, se analizó la proliferación de células de bazo de ratones vacunados con α -DEC-205:NPCD4/HAB, péptidos NPCD4/HAB, α -DEC-205HACD4/M2e, péptidos HACD4/M2e y PBS, retados con A/H3N2/NT/60/68. A diferencia del experimento anterior en donde las células de bazo se recuperaron al día 8 post-infección, estas fueron obtenidas hasta el día 50 p.i. (reto subletal, A/H3N2/NT/60/68), con el objetivo de evaluar si el direccionamiento de antígeno de epitopos para células T CD4⁺ promueve la generación de memoria a largo plazo. La **figura 18** resume los resultados de proliferación para cada grupo experimental con los diversos estímulos empleados. Cuando se analizó la proliferación 50 d.p.i. del epítipo NPCD4 al ser direccionado hacia DEC-205 junto con el

epítipo HAB se encontraron niveles basales de proliferación, similares a los que se obtuvieron con los controles experimentales negativos (Sin estímulo y líquido alantoideo negativo a VIA). Sin embargo, cuando fueron administrados como péptidos libres, estos indujeron un aumento en la proliferación de esplenocitos, particularmente cuando fueron estimulados con el péptido NPCD4, el cual alcanzó aproximadamente un 15% de proliferación (**Fig 18-A**).

Por otro lado, en este mismo experimento al analizar la proliferación específica de células específicas de M2e en esplenocitos recuperados de ratones vacunados con los epitopos M2e y HACD4 direccionados hacia DEC-205 de manera conjunta, se obtuvo una proliferación de aproximadamente el 25%, el cual está por encima de la respuesta policlonal heterosubtípica que se obtiene cuando se estimula con líquido alantoideo H1N1+ (aprox. 20%) (**Fig 18-B**), pero por debajo de la que se obtiene con el estímulo de líquido alantoideo H3N2+ (por encima del 30%), el cual es el virus que se usó para el reto subletal. La respuesta hacia M2e cuando fue direccionado hacia DEC-205 es sustancialmente mayor a la que se obtiene cuando los ratones fueron vacunados con los péptidos M2e y HACD4 (<20%). En el mismo experimento se analizó la respuesta de proliferación hacia el epítipo HACD4, el cual permanece en niveles basales después de 50 d.p.i en los grupo de ratones con direccionamiento y sin direccionamiento hacia DEC-205, sin embargo aquellos ratones que no recibieron tratamiento alguno con HACD4 durante el esquema de inmunización (PBS), se detectó un aumento en la proliferación por el encima del 15%, el cual fue inducido sin duda por el reto subletal.

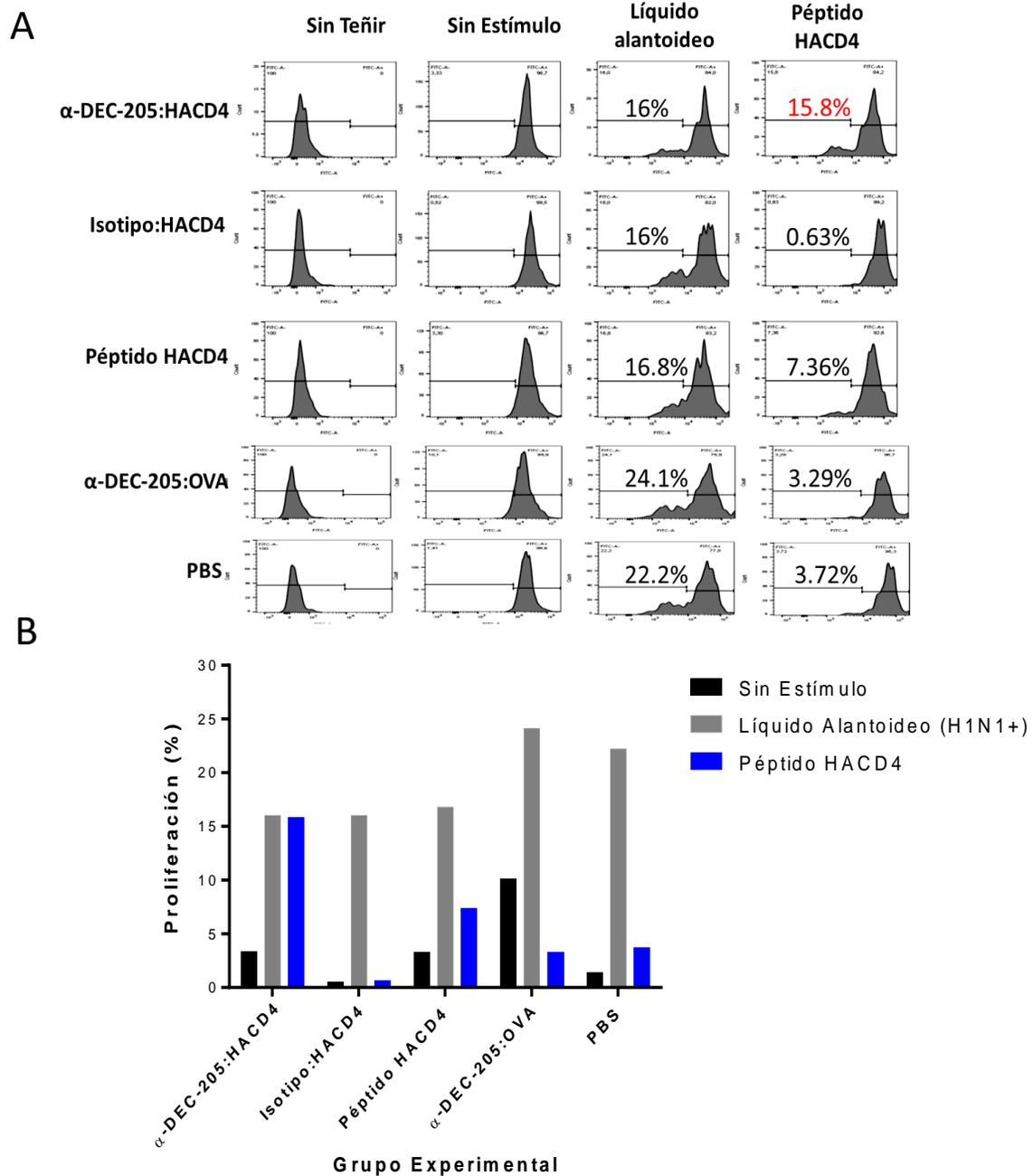


Figura 17. Proliferación de células de bazo procedentes de ratones inmunizados con anticuerpos conjugados y retados con dosis subletal de A/H3N2/NT/60/68. Se realizó un pool de células de bazo con dos ratones por cada grupo experimental (8 d.p.i., reto subletal H3N2) y se tiñeron con 50 μ M de CFSE. Las células fueron estimuladas con el péptido NPCD4 por 96 horas y posteriormente se analizó la proliferación específica por citometría de flujo (A), los porcentajes de proliferación para cada grupo se muestran en una gráfica de barras en (B). La imagen es representativa de un experimento.

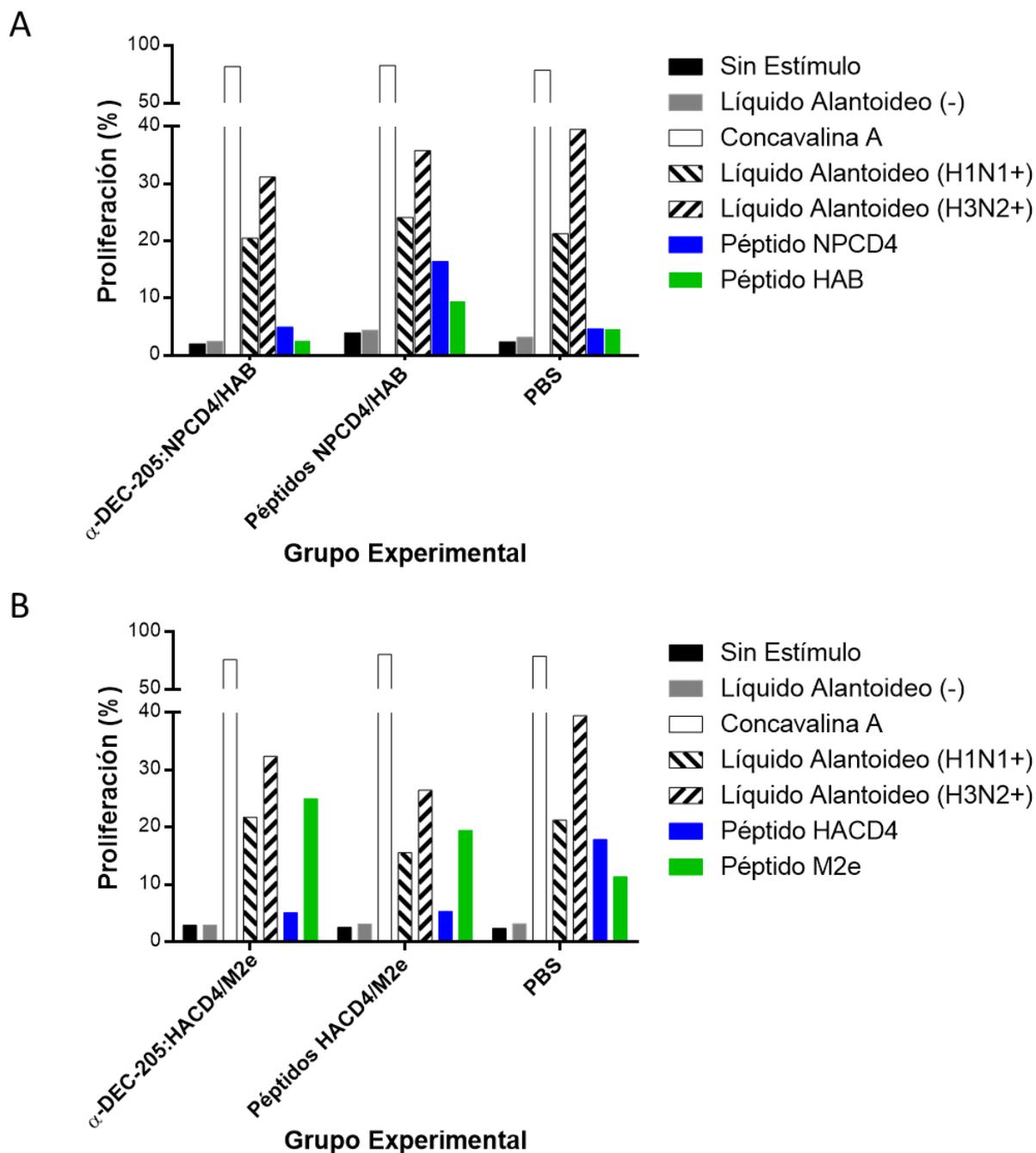


Figura 18. Proliferación de células de bazo de ratones inmunizados con anticuerpos conjugados y retados con dosis subletal de A/H3N2/NT/60/68. Se realizó un pool de células de bazo con dos ratones por cada grupo experimental (50 d.p.i.; reto subletal H3N2) y fueron teñidas con 50 μ M de CFSE. Las células fueron estimuladas con el péptido NPCD4 ó HAB (A) o con HACD4 ó M2e (B) por 96 horas. Como controles positivos de proliferación se usó líquido alantoideo infectado con virus H1N1 ó H3N2, y concavalina A, y como controles negativos se usó líquido alantoideo sin infectar y células sin estimular. Posteriormente se analizó la proliferación específica por citometría de flujo, se muestran los porcentajes de proliferación en cada caso. La imagen es representativa de un experimento.

Conclusiones de la prueba de concepto

En conjunto, estos resultados preeliminares sugieren que a pesar de no tener respuesta protectora ante el reto letal con IAV cuando los epitopos NPCD4 y HACD4 fueron direccionados hacia DEC-205, es muy probable que hubiera más células específicas previo y durante el reto, comparado con el grupo de ratones fueron inmunizados con los péptidos sin direccionamiento hacia DEC-205.

Por otro lado, el direccionamiento hacia DEC-205 del epítipo M2e, resultó en un aumento en la respuesta de anticuerpos específicos y en la sobrevivencia ante un reto letal con IAV. Además, el direccionamiento hacia DEC-205 de M2e promovió una respuesta de larga duración, que se evidenció con los niveles altos de proliferación cuando células de bazo fueron estimuladas 50 d.p.i, sugiriendo que esta estrategia de vacunación empleada con el epítipo M2e incrementa la generación de células específicas de memoria.

Aunque los resultados obtenidos con los experimentos empleando los epitopos HACD4 y NPCD4 son interesantes desde el punto de vista inmunológico, nos inclinamos en caracterizar mejor la respuesta protectora aumentada que induce M2e al ser direccionado hacia DEC-205.

Direccionamiento de M2e hacia DEC-205

Caracterización de anticuerpos entrecruzados con antígeno

Los anticuerpos α -DEC-205 y el control de isotipo purificados mediante el cultivo de los hibridomas NLDC145 y III-10 se entrecruzaron bioquímicamente con M2e y OVA, como antígeno irrelevante. Los anticuerpos libres y conjugados a antígeno se resolvieron en un gel 10/15% de acrilamida bajo condiciones reductoras y no reductoras y se analizaron por Western blot usando un anticuerpo anti-IgGs de rata. Como se esperaba, en condiciones no reductoras el anticuerpo no conjugado α -DEC-205 apareció como una banda de 150 kDa, mientras que los anticuerpos conjugados con M2e (α -

DEC-205:M2e e isotipo:M2e) mostraron dos bandas predominantes: una de aproximadamente 150 kDa y la otra con un peso máximo de alrededor de 180 kDa (**Figura 19, izquierda**). Cuando se usó un anticuerpo específico para M2e, ambas bandas fueron detectadas (**Figura 19, derecha**).

Estos resultados indican que los anticuerpos se conjugaron exitosamente a los antígenos, siendo el entrecruzado de α -DEC-205 e isotipo a M2e heterogéneo, ya que la banda de 150 kDa parece estar compuesta del anticuerpos unido a pocos péptidos M2e, aunque la presencia de anticuerpo libre no se descarta. Mientras que la banda de 180 kDa representa el anticuerpo unido a aproximadamente 12 moléculas del péptido. Cuando las muestras se resolvieron bajo condiciones reductoras y se revelaron con un anticuerpo anti-IgGs de rata, se observó una completa reducción, ya que aparecen dos bandas únicamente de 25 y 55 kDa, correspondiendo a las cadenas ligera y pesada respectivamente (**Figura 19**). Por otro lado, los conjugados reducidos generaron las badas de 25 y 55 kDa, así como otras bandas con pesos que variaron de 130-160 kDa, desapareciendo la banda de 180 kDa, sugiriendo que los conjugados no fueron reducidos completamente. Cuando el anticuerpo anti-M2e se usó, se observó un patrón similar pero con una banda discreta de aproximadamente 2.7 kDa correspondiendo al péptido libre M2e (**Figura 19**). Estos resultados indican que el enlace tioeter entre el anticuerpo y el péptido es altamente resistente a agentes reductores y que el péptido unido puede estar protegiendo los enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. Sin embargo, es claro que las cadenas ligera y pesadas se pueden entrecruzar con al menos un péptido.

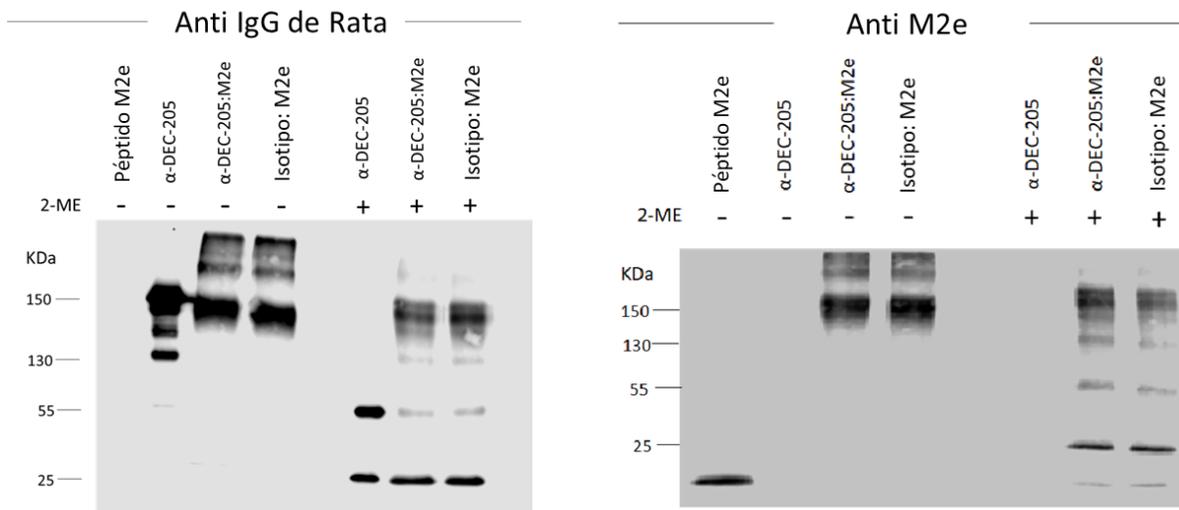


Figura 19. Caracterización de anticuerpos monoclonales conjugados con antígeno. El péptido M2e y OVA se conjugaron al anticuerpo monoclonal α -DEC-205, mientras que el control de isotipo se conjugó solamente con M2e. Los anticuerpos conjugados se resolvieron en un gel de acrilamida 10/15% bajo condiciones reductoras y no reductoras y se analizaron por Western blot. (izquierda) la membrana se trató con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgGs de rata, seguido de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgGs de conejo conjugado a peroxidasa. (derecha) La membrana se trató con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-M2e (14C2), seguido de un anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón-HRP. La señal se desarrolló por quimioluminiscencia. La presencia o ausencia de 2-SE ME indica arriba de cada carril con símbolos (+ y -, respectivamente).

Con el fin de conocer la cantidad exacta de péptido M2e que se unió a cada anticuerpo se realizaron ensayos de slot blot, en los cuales se cargaron a una membrana de nitrocelulosa cantidades conocidas de cada anticuerpo y se reveló con el anticuerpo anti-M2e. La cantidad de M2e unido se determinó comparando con la curva que se generó con la señal de péptido libre. De esta manera se determinó que el péptido M2e representa de 4 al 10% de la masa total de los conjugados (**Figura 20**).

Para determinar si los conjugados mantuvieron su especificidad a DEC-205, se derivaron células dendríticas de médula ósea y se tiñeron con anticuerpos contra CD11c, α -DEC-205, α -DEC-205:OVA, α -DEC-205:M2e o isotipo:M2e, y se analizaron por citometría de flujo. El anticuerpo α -DEC-205 tiñó aproximadamente el 27% de las células dendríticas cuando se usó un anticuerpo policlonal anti-rata (**Figura 21**). Un porcentaje similar se tiñó con α -DEC-205:OVA, seguido de un anticuerpo policlonal anti-OVA, o con el α -DEC-205:M2e seguido del anticuerpo anti-M2e. El anticuerpo isotipo:M2e tiñó a niveles basales. De esta manera, aunque ambas cadenas del anticuerpo α -DEC-205 se pueden conjugar con M2e, no tiene un efecto en la especificidad del anticuerpo hacia DEC-205.

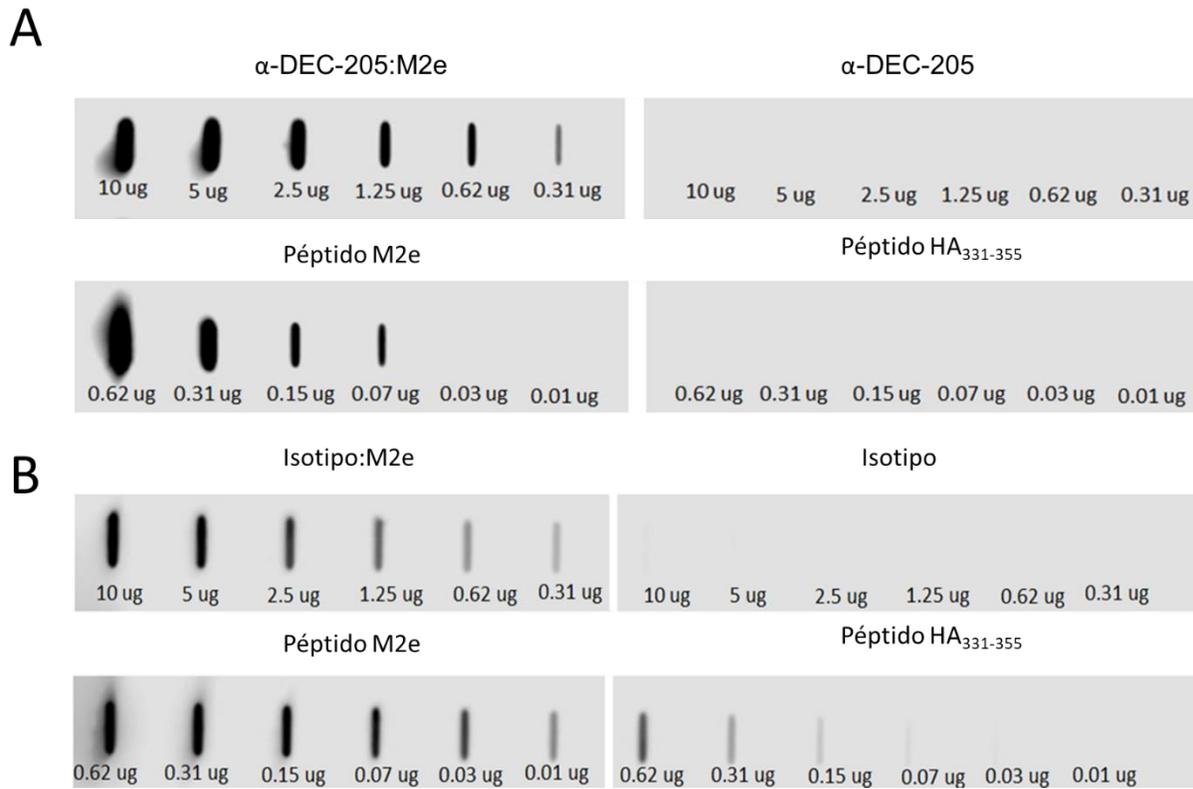


Figura 20. Cuantificación de M2e unido al anticuerpo α -DEC-205 e isotipo. Se realizaron diluciones seriales de los anticuerpos α -DEC-205:M2e y α -DEC-205 (A) e isotipo:M2e e isotipo (B) y se inmovilizaron en una membrana de nitrocelulosa, la cual fue tratada con el anticuerpo anti-M2e, seguido de un anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón-HRP. La cantidad de péptido M2e unido a cada anticuerpo se extrapólo de la curva estándar que se construyó con la señal del péptido solo. El péptido HA₃₃₁₋₃₅₅ se usó como control negativo. La señal se desarrolló por quimioluminiscencia y se analizó con el software ImageJ.

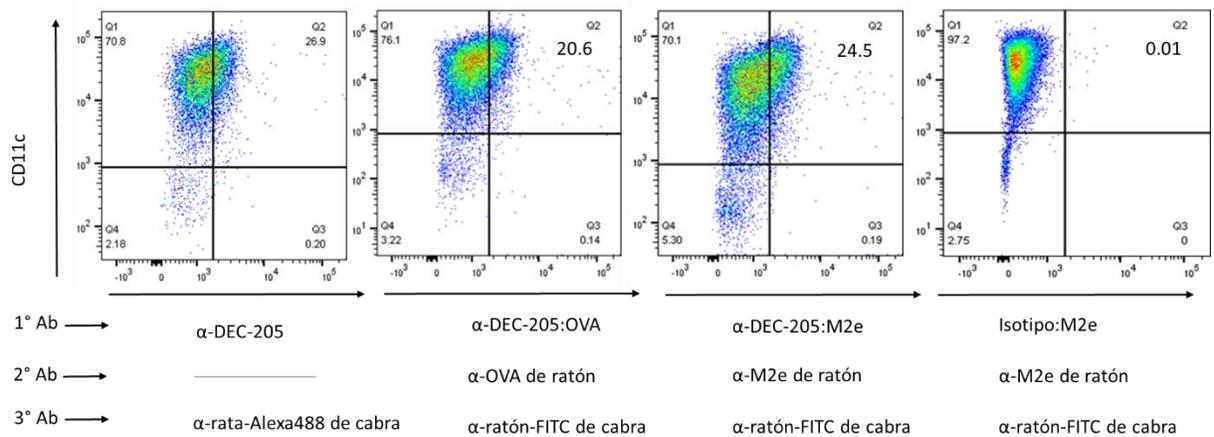


Figura 21. Los anticuerpos conjugados a antígeno mantienen su especificidad por DEC-205. Se derivaron células dendríticas de médula ósea de ratón y se usaron para verificar la especificidad de los anticuerpos conjugados por citometría de flujo. Las BMDC se tiñeron con el anticuerpo α-CD11c-biotina (seguido por streptavidina APC) y 5 ug de α-DEC-205 y sus conjugados. El anticuerpo α-DEC-205 se detectó con un anticuerpo policlonal anti IgGs de rata conjugado a Alexa488. Los anticuerpos acoplados a M2 (α-DEC-205:M2e e isotipo:M2e) se detectaron con el anticuerpo 14C2 seguido de un anticuerpo policlonal de cabra anti IgG de ratón marcado con FITC. El anticuerpo α-DEC-205:OVA se detectó con un anticuerpo policlonal de ratón anti-OVA seguido del mismo anticuerpo policlonal de cabra anti IgG de ratón marcado con FITC.

El direccionamiento de M2e hacia DEC-205 generó una mejor respuesta inmune comparada con péptido libre M2e

Para evaluar la inmunogenicidad del anticuerpo conjugado, ratones BALB/c fueron inmunizados tres veces s.c. con α -DEC-205:M2e o isotipo:M2e equivalentes a 1ug/ratón de péptido M2e, 5 ug de péptido M2e ó 10 ug de α -DEC-205:OVA total, todos en presencia de 50 ug de poly I:C como adyuvante. Cuando se analizó el título de anticuerpos IgG específicos de M2e, el conjugado α -DEC-205:M2e generó 40 veces más anticuerpo que los controles, y los anticuerpos IgG1 fueron predominantes sobre los anticuerpos IgG2a (**Figura 22**). Estos resultados demuestran que el direccionamiento de M2e a DEC-205 induce una respuesta de anticuerpos IgG mayor que el péptido M2e, aún usando 5 veces menos antígeno. También sugiere que, debido a que los anticuerpos IgG1 son predominantes, una respuesta preferencialmente tipo Th2 es inducida.

Para determinar si α -DEC-205:M2e induce protección heterosubtípica hacia una infección por IAV, los ratones fueron inmunizados como se describió anteriormente. Dos semanas después de la última inoculación, los ratones fueron infectados con una dosis letal de A/H1N1/New Caledonia/20/99 o A/H3N2/NT/60/68. Los ratones mostraron prácticamente la misma morbilidad (evaluada como pérdida de peso) que los controles (**Figura 23-A**). Sin embargo, los que fueron inmunizados con α -DEC-205:M2e mostraron un aumento significativo en la supervivencia (>76%) después de ser infectados con A/H1N1/New Caledonia/20/99 o A/H3N2/NT/60/68, comparado con lo mostrado por los controles de péptido libre M2e o isotipo:M2e, los cuales tuvieron un aumento en la supervivencia que varió del 20-40% (**Figuras. 23-B y C**).

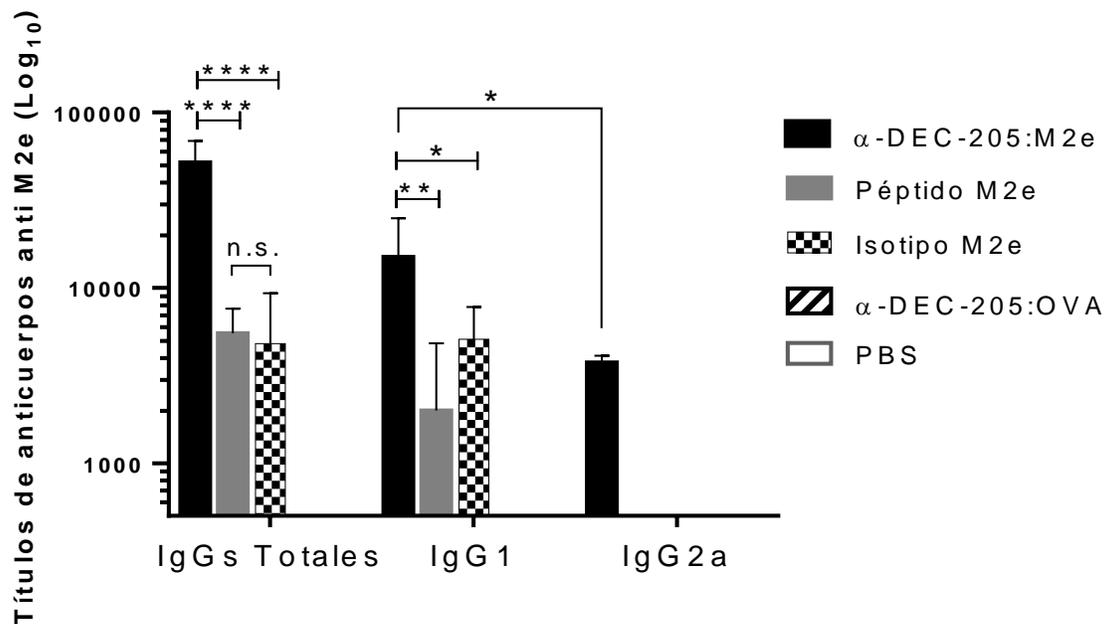


Figura 22. Título de anticuerpos anti-M2e en ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e. Se realizó un pool de suero de ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e y los grupos control, se hicieron diluciones seriadas para cada uno en PBS (1:500 a 1:128,000). Se realizó un ensayo de ELISA para detectar anticuerpos séricos específicos para M2e, como se describe en materiales y métodos. Los títulos de anticuerpos se expresan como la mitad del valor máximo de absorbancia para cada grupo experimental y representado como la media \pm SD de dos experimentos independientes (cada uno con 6 ratones por grupo). Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan como valores P (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001)

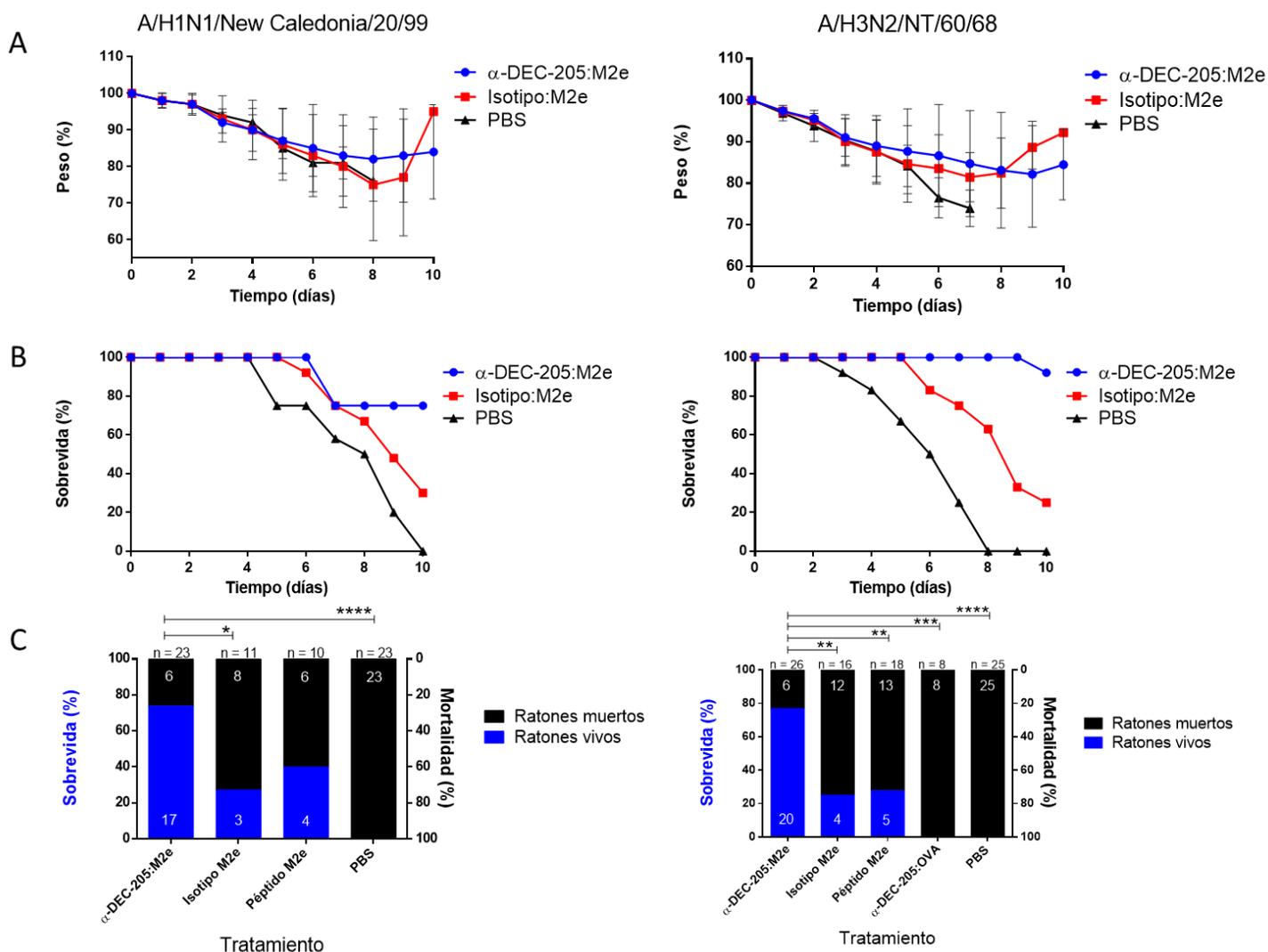


Figura 23. El direccionamiento de M2e a DEC-205 aumenta la protección heterosubtípica en contra de Virus Influenza A. Ratones inmunizados fueron retados i.n. con 30LD₅₀ de A/H3N2/NT/60/68 ó A/H1N1/New Caledonia/20/99 en el día 57 de acuerdo al esquema de vacunación. Se construyeron gráficas de pérdida de peso (A) y sobrevida (B) con datos de dos experimentos independientes (cada uno con seis ratones por grupo). Las barras verticales indican la desviación estándar de la media del peso diario para cada grupo experimental. (C) Sobrevida total de 2 a 5 experimentos independientes en contra de A/H1N1/New Caledonia/20/99 (izquierda) ó A/H3N2/NT/60/68 (derecha), representada como números absolutos acumulados de ratones vivos y muertos, graficados en barras normalizadas al 100%. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan como valores P (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001).

Estos resultados indican que el direccionamiento de M2e, aunque no previene la enfermedad, potencia una respuesta protectora heterosubtípica que mejora la sobrevida, en comparación con el uso de cinco veces más péptido M2e ó con el anticuerpo control de isotipo conjugado con M2e.

Diferentes rutas de administración de α -DEC-205:M2e inducen altos niveles de protección

Con el objetivo de evaluar otras rutas de administración, ratones hembra de la cepa BALB/c fueron inmunizados con el conjugado α -DEC-205:M2e via subcutánea, intraperitoneal ó intranasal siguiendo el esquema de inmunización antes descrito. La **figura 24** describe la pérdida de peso y la sobrevida que registró cada grupo experimental posterior al reto. En este ensayo. todas las vías de administración registraron altos grados de sobrevida, siendo las más altas las alcanzadas con la vía i.n y la s.c. (100%), mientras que la vía intraperitoneal registró un 75%. En cuanto al progreso de la enfermedad, todos los grupos perdieron peso de manera similar hasta el día 7. En este punto, el grupo que recibió la vacuna vía i.n. comienza un ascenso en el promedio de su peso, y el grupo de la vacuna administrada de manera s.c. lo estabilizó permanentemente. Por otro lado, el grupo que recibió la vacuna i.p. retrasa su recuperación un día con respecto a los demás, y el grupo de PBS presenta una pendiente permanente hasta el día 10, el cual es el último registro debido a que todos los ratones murieron o se sacrificaron debido a que perdieron más del 25% de su peso y se consideró como muerte relacionada a infección por IAV. Estos resultados sugieren que múltiples vías de inmunización pueden ser utilizadas con esta estrategia de vacunación.

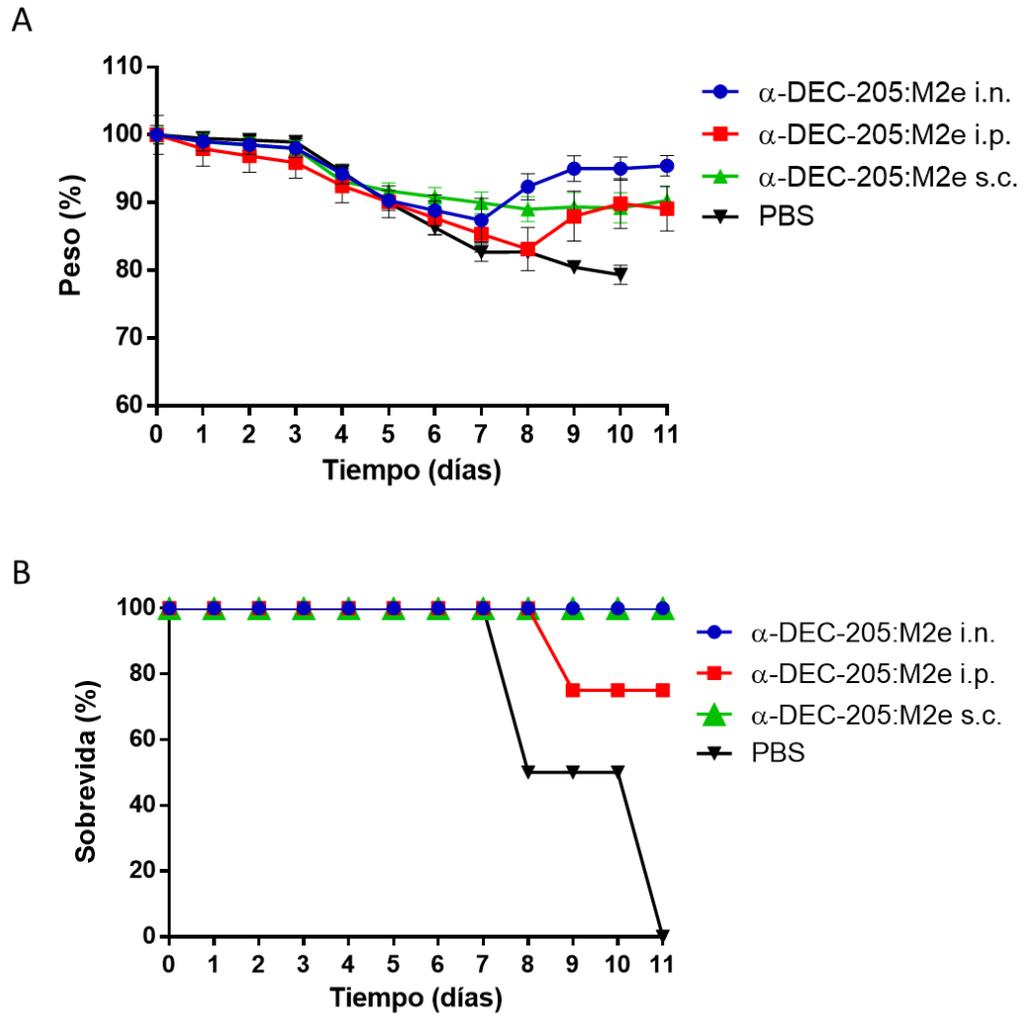


Figura 24. Diferentes vías de inmunización con α -DEC-205:M2e inducen protección 4 Ratones por grupo inmunizados por diferentes vías fueron retados i.n. con 30LD₅₀ de A/H3N2/NT/60/68 ó A/H1N1/New Caledonia/20/99 en el día 57 de acuerdo al esquema de vacunación. Se construyeron gráficas de pérdida de peso (A) y sobrevida (B). Las barras verticales indican la desviación estándar de la media del peso diario para cada grupo experimental

Los anticuerpos séricos anti-M2e inducidos por el direccionamiento a DEC-205, pero no las células T CD4⁺ efectoras, son los responsables de la protección

Estudios previos han mostrado que la respuesta inmune protectora inducida por el péptido M2e se debe principalmente a anticuerpos séricos (133-135), aunque recientemente se publicó en otro estudio que las células T CD4⁺ anti-M2e efectoras también están implicadas (125). Con el objetivo de determinar si los anticuerpos séricos son responsables de la protección observada, ratones fueron inmunizados con el anticuerpo α -DEC-205:M2e, y dos semanas después de la tercera inmunización, se colectó el suero y se transfirió a ratones naive, seguido de un reto letal con IAV H3N2/NT/60. Como controles positivos de protección se utilizó un grupo de ratones inmunizados con el anticuerpo conjugado α -DEC-205:M2e, mientras que como controles negativos, ratones naive se transfirieron con suero de ratones inoculados únicamente con poly I:C, o ratones naive sin transferencia. Solamente los ratones naive que recibieron suero procedente de ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e presentaron una sobrevivencia similar que los ratones inmunizados de la misma forma (**Figura 25**). Como era esperado, los anticuerpos anti-M2e séricos no fueron neutralizantes *in vitro* (**Figura 26**), ya que está reportado que ejercen sus funciones protectoras debido al reconocimiento de M2e en la membrana de células infectadas y a la cooperación con macrófagos y células NK por la región Fc del anticuerpo (136, 137).

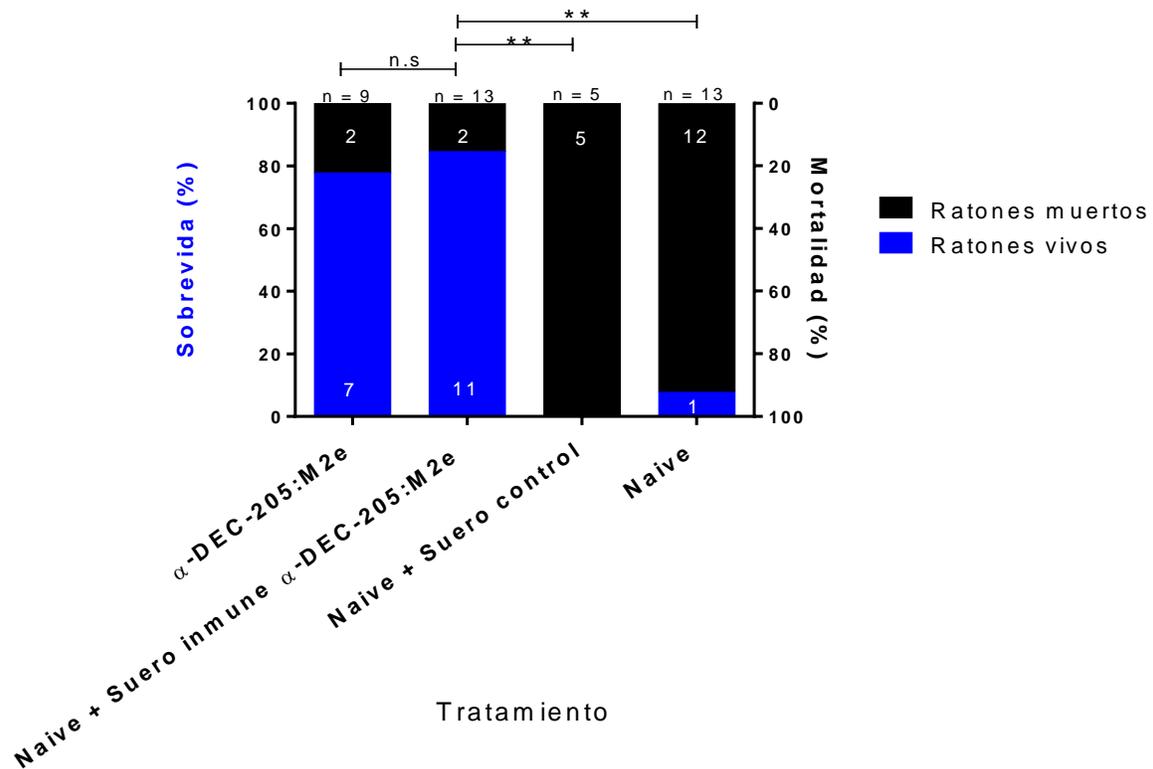


Figura 25. La transferencia adoptiva de suero anti-M2e induce protección en contra de la infección por IAV. Sobrevida total en contra del reto letal con 30LD₅₀ de A/H3N2/NT/60/68 (derecha) representada como números absolutos acumulados de ratones vivos y muertos, graficados en barras normalizadas al 100%. Los grupos experimentales representados incluyen ratones naive que fueron transferidos i.p. con 350 uL/ratón de un pool de suero obtenido de ratones inmunizados con α-DEC-205:M2e (post tercera inmunización) (Títulos de anticuerpos anti-M2e Abs; IgG: 1:52,000, IgG1: 1:15,000 and IgG2a: 1:3,750), como controles negativos, ratones naive recibieron suero de ratones inmunizados con PBS más poly I:C, y ratones naive sin transferencia de suero, como control positivo de protección se usaron ratones inmunizados con α-DEC-205:M2e. La figura representa la sobrevida total de 1 a 3 experimentos representada como números absolutos acumulados de ratones vivos y muertos, graficados en barras normalizadas al 100%. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan como valores P (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001).

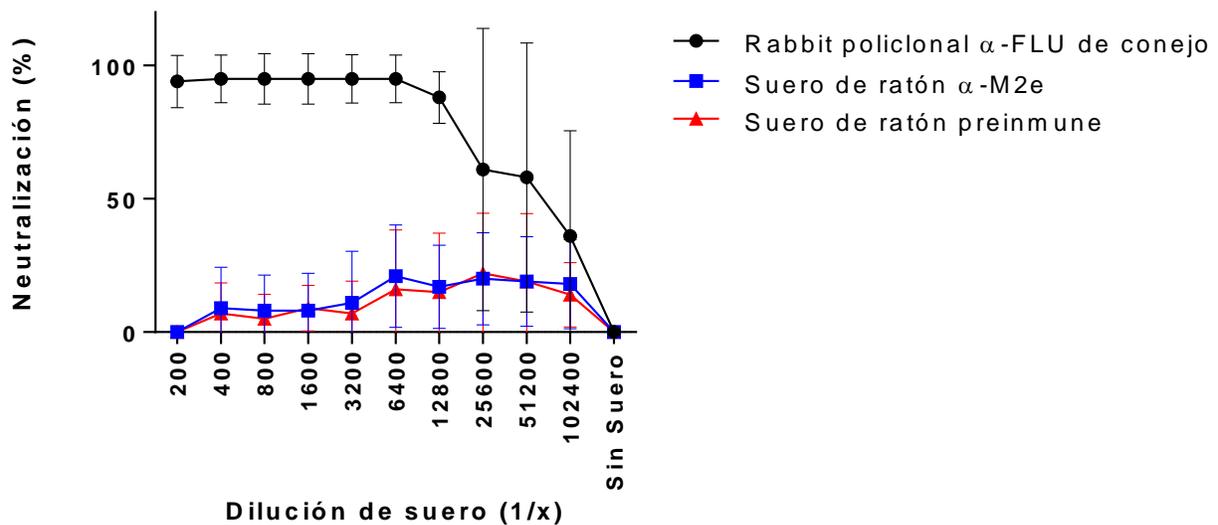


Figura 26. Los anticuerpos anti-M2e generados ante la inmunización con α -DEC-205:M2e no son neutralizantes in vitro. Diluciones seriadas en medio DMEM de un pool de suero obtenido de ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e (post tercera inmunización) se mezclaron con 100 pfu de IAV H1N1/New Caledonia/20/99 y se incubó por 1h a 37°C. Como controles de neutralización se usaron suero de ratón pre-inmune (negativo) y un anticuerpo de conejo anti-FLU (positivo) y se trataron en las mismas condiciones. Después del periodo de incubación, la mezcla se añadió a una monocapa de células MDCK en placas de 96 pozos y se incubó otra hora a 37°C. Después de este periodo, el inóculo se reemplazó por medio DMEM fresco que contiene 1ug/mL de tripsina tratada con TPCK y se incubó por 18-20 horas a 37°C. Posteriormente, las placas se congelaron y descongelaron tres veces y el lisado resultante se usó como antígeno en un ensayo de ELISA para determinar carga viral, como se describe en materiales y métodos. La gráfica muestra la media del porcentaje de neutralización de tres experimentos independientes, el cual fue calculado considerando 0% el valor de absorbancia obtenido de células MDCK sin suero. Las barras representan la \pm SD para cada valor de media de absorbancia obtenida en cada grupo a determinado tiempo

Para determinar si las células T CD4⁺ estaban involucradas en la protección como células efectoras, a ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e se les eliminó la población de células T CD4⁺ con el anticuerpo monoclonal de rata GK1.5 administrado en los días -3, 0 y +3, con respecto al día del reto con virus A/H3N2/NT/60/68. Para este anticuerpo (GK1.5), se reportaron niveles de eliminación muy cercanos al 100%, en ratones BALB/c naive después de la última administración de GK1.5 con el mismo esquema que se usó en el presente ensayo (**Figura 27-B**). Como control positivo de protección se usaron ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e sin tratamiento, y como control negativo, se usaron ratones naive. Como se observa en la **figura 27-A**, la eliminación de células T CD4⁺ no tuvo efecto en la protección inducida, lo que indica que las células T CD4⁺ efectoras no participan en la protección inducida por el direccionamiento de M2e a DEC-205.

El direccionamiento de M2e a DEC-205 no es efectivo en ratones C57BL/6

Trabajos previos con diferentes estrategias de vacunación basadas en M2e han mostrado que la inmunidad hacia M2e varía entre animales con diferente fondo genético (63). Para determinar si el direccionamiento de M2e a DEC-205 tiene efectividad en un modelo de ratón con un fondo genético diferente que el de BALB/c (H-2^d), ratones C57BL/6 (H-2^b) fueron inmunizados con α -DEC-205:M2e, péptido M2e o PBS en presencia de 50 ug/ratón de poly I:C y retados con 30LD₅₀ de A/H3N2/NT/60/68. Como se aprecia en la **figura 28**, el direccionamiento de M2e a DEC-205 no proporcionó protección, ya que el total de los ratones murieron al día 8 p.i., similar a lo ocurrido con el grupo de ratones inmunizados con PBS. Mientras que los animales que recibieron 5 ug de péptido M2e sobrevivieron un 33%, similar a lo que se reportó anteriormente con ratones BALB/c inmunizados y retados de la misma manera.

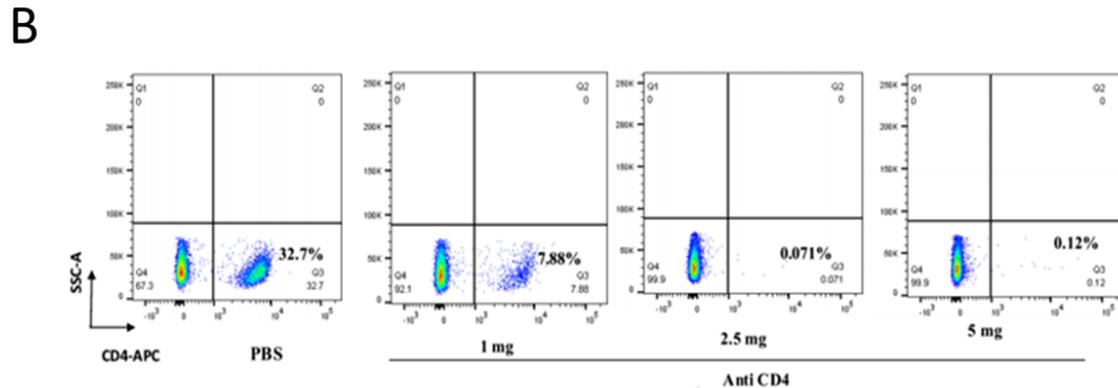
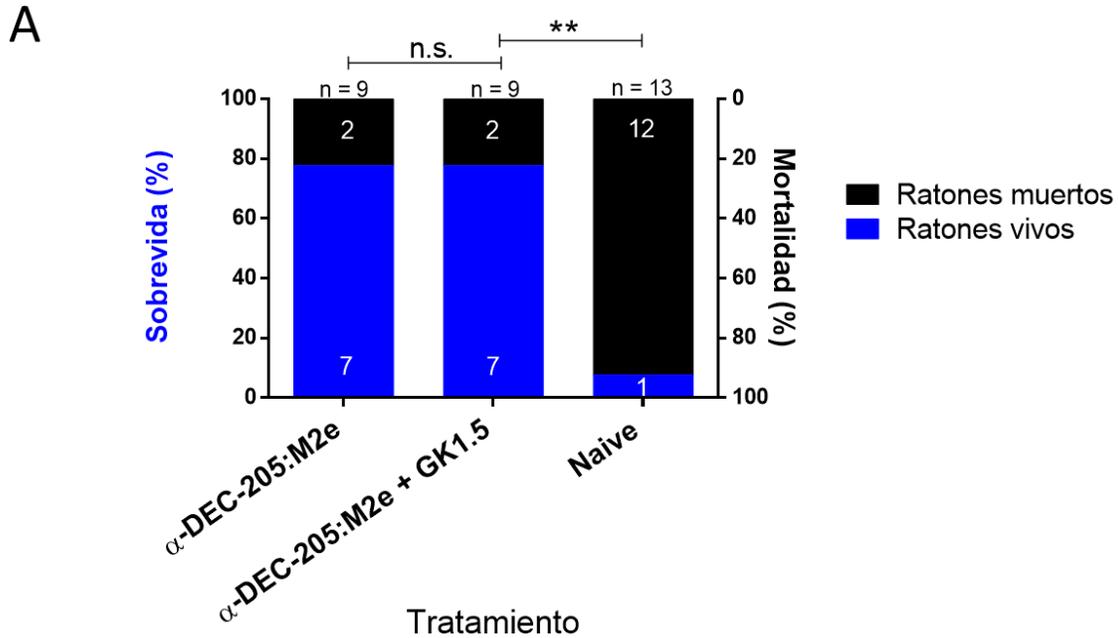


Figura 27. Las células T CD4⁺ efectoras no son responsables de la protección inducida por α -DEC-205:M2e. (A) Sobrevivida total en contra del reto letal con 30LD₅₀ de A/H3N2/NT/60/68 (derecha) representada como números absolutos acumulados de ratones vivos y muertos, graficados en barras normalizadas al 100%. Los grupos experimentales representados incluyen ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e a los que se trataron con anticuerpo GK1.5 en los días -3, 0 y +3 con respecto al día del reto. Como controles se usaron grupos de ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e y ratones naive. La figura representa la sobrevivida total de 1 a 3 experimentos representada como números absolutos acumulados de ratones vivos y muertos, graficados en barras normalizadas al 100%. Las diferencias estadísticamente significativas se simbolizan como valores P (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001). (B) Eliminación de células T CD4⁺ en ratones BALB/c. Para corroborar la funcionalidad del anticuerpo GK1.5, ratones BALB/c fueron tratados vía i.p. con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD4 purificado del hibridoma GK1.5 en tres dosis separadas por tres días cada una. Posterior a la tercera dosis se extrajo el bazo a cada ratón y se tiñeron los esplenocitos con un anticuerpo anti-CD4 marcado con APC y se evaluó por citometría de flujo la presencia de células T CD4⁺. El control negativo de este experimento fue un ratón tratado con PBS. Este resultado fue tomado de la tesis de la M. en C. Yunuen Acevedo Betancur.

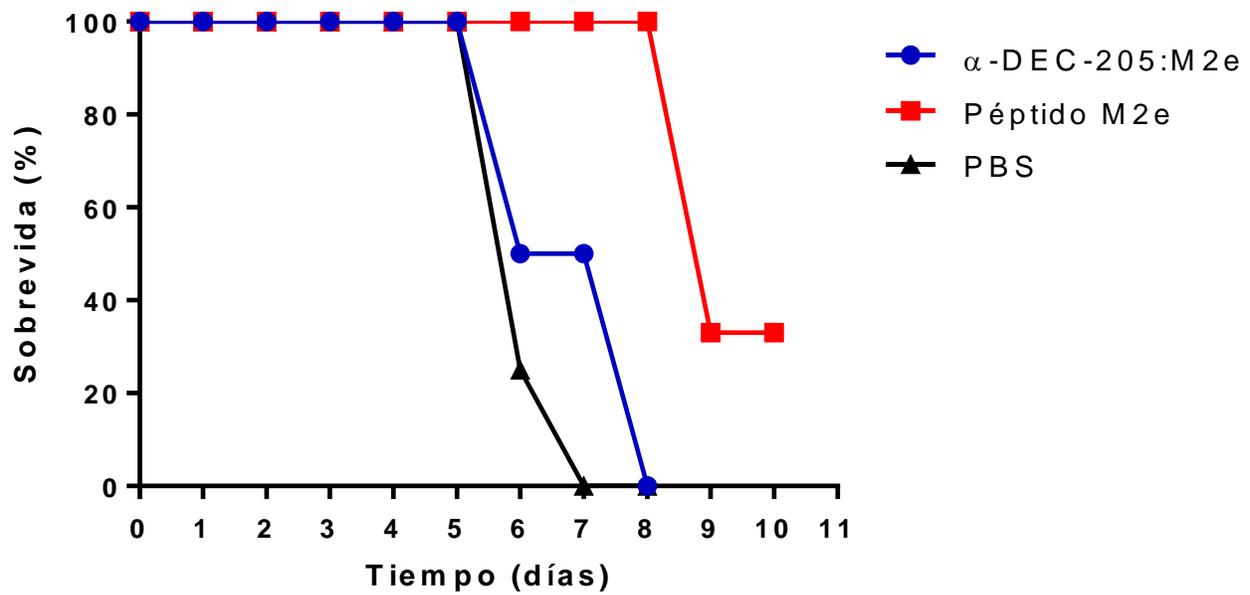


Figura 28. En ratones C57BL6 el direccionamiento hacia DEC-205 no induce protección 3-4 ratones C57BL6 por grupo inmunizados con α -DEC-205:M2e, péptido M2e y PBS, todos en presencia de poly I:C fueron retados i.n. con 30LD₅₀ de A/H3N2/NT/60/68 en el día 57 de acuerdo al esquema de vacunación. Se presenta los datos de un experimento representativo en donde se grafica la curva sobrevivida con respecto al tiempo para cada grupo experimental.

DISCUSIÓN

Los IAV son responsables de aproximadamente medio millón de muertes cada año, y en la actualidad existe el riesgo de que nuevas cepas surjan debido a sus mecanismos de evolución, causando una pandemia mundial. A pesar de la existencia de vacunas estacionales, su eficacia depende de la exactitud de la elección de las cepas de IAV cada año, y por ende pueden tener poco o nulo impacto sobre los virus ocasionantes de pandemias (138). Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de una “vacuna universal” que pueda proteger en contra de cualquier cepa de IAV mediante la implementación de antígenos altamente conservados junto con estrategias que incrementen su inmunogenicidad. Acorde con esto, en el presente trabajo, epítomos altamente conservados (de células T CD4⁺ y B) de proteínas de IAV fueron direccionados hacia DC mediante un anticuerpo específico para el receptor endocítico DEC-205 conjugado químicamente a péptidos sintéticos derivados de cada epítomo, en presencia de poly I:C como adyuvante, con el fin de aumentar la respuesta inmune protectora heterosubtípica.

DEC-205 está altamente expresado en la superficie de DC, y su función es internalizar antígenos y entregarlos a endosomas que contienen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), promoviendo su presentación a células T CD4⁺ o presentación cruzada a células T CD8⁺. Por lo tanto, direccionar antígenos a DEC-205 ha sido usado para inducir respuestas de células T, ya sea inflamatorias, para enfermedades infecciosas o cáncer (con adyuvante) o tolerogénicas para el caso de enfermedades autoinmunes (sin adyuvante) (ver tabla 1) (88, 91, 94, 97, 105, 139-143). Además, distintos estudios han mostrado que el direccionamiento de antígenos a DEC-205 puede también inducir respuestas protectoras de anticuerpos (92, 93, 98, 106).

Direccionamiento de HAB, HACD4 y NPCD4 a DEC-205

En resultados preliminares, el direccionamiento de los epítomos HAB y los epítomos para células T CD4⁺, aunque no fueron los esperados, son interesantes para el análisis y la formulación de nuevas hipótesis. Cuando estos epítomos se direccionaron a DEC-205, no resultó en respuesta de anticuerpos (para el caso de HAB) ni en aumento de la sobrevivencia. Además, cuando los epítomos para células T CD4⁺ se direccionaron parecieron tener un efecto que contrarrestó la protección inducida por la administración de cada péptido libre, o cuando se administró en conjunto con α -DEC-205:M2e. Sin embargo, al analizar la respuesta específica de proliferación y liberación de IL-2 en esplenocitos de ratones vacunados (pre y post-reto con IAV) estimulados con los péptidos, en todos los casos hubo proliferación específica de cada epítomo, lo que sugiere que el direccionamiento de antígeno a DEC-205 probablemente sí está presentando antígenos a células T, sin embargo, no están adquiriendo un fenotipo protector, o están provocando mayor patología por la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias.

Es probable que la respuesta obtenida sea consecuencia de la naturaleza de cada epítomo direccionado. Acorde con esto, los diversos epítomos capaces de montar respuesta de células T CD4⁺ presentan diferentes grados de vida media de unión a moléculas de MHC clase II, y esto está directamente relacionado con la intensidad de señal que inducirá sobre el TCR durante la activación. Está reportado que la fuerza de señalización por el receptor de células T es determinante para su diferenciación a un fenotipo en particular(144). En general, una fuerte señalización por el TCR favorece la diferenciación de células T cooperadoras al fenotipo Th1(145). Además, la señalización diferencial que tiene lugar durante el primer encuentro con el antígeno, tiene repercusiones sobre la sensibilidad a antígeno durante el reto con IAV. En este sentido, Nagaoka et al (146), encontraron que la inmunización de ratones con péptidos de baja estabilidad al TCR indujeron células T CD4⁺ efectoras

que proliferaron y produjeron IL-17A después del reto con IAV. En contraste, células efectoras inducidas con péptidos de alta estabilidad se mostraron un fenotipo terminalmente diferenciado y no proliferaron ante el reto.

Direccionamiento de M2e a DEC-205

El resultado más sobresaliente de este estudio fue la protección incrementada que se obtuvo al direccionar el ectodominio de la proteína M2 (M2e) de IAV a DEC-205 en presencia de poly I:C, como adyuvante. A pesar de no obtenerse diferencias significativas en la pérdida de peso entre el grupo de ratones inmunizados con α -DEC:205:M2e y los grupos control (PBS e isotipo:M2e), se registró un aumento de supervivencia total de 76% cuando se direccionó el péptido de M2e (3 ug/ratón administrado en tres dosis) a DC vía DEC-205, lo cual contrasta con el 20-40% de protección que se logró con cantidades equivalentes de M2e unido al anticuerpo control de isotipo, o cuando se administró cinco veces más péptido libre M2e.

En respuesta a la infección por IAV en humanos, los niveles de anticuerpos específicos de M2e son bajos o nulos (64). Sin embargo, estudios experimentales en modelos animales con diferentes estrategias de vacunación basados en M2e han determinado que los anticuerpos anti-M2e tienen una alta reactividad cruzada entre cepas de IAV, y por ende, inducen altos niveles de protección heterosubtípica (134). A pesar de que estos anticuerpos no son neutralizantes, contribuyen a la protección uniéndose a M2 expuesto en la superficie de células infectadas, y cooperando con macrófagos o células NK vía receptores Fc γ (FcR γ) (136, 137, 147, 148). De manera similar en nuestro trabajo, el direccionamiento de M2e a DEC-205 incrementó la producción de anticuerpos IgG séricos específicos, y como era de esperarse no fueron neutralizantes *in vitro*. Además, los anticuerpos

anti-M2e resultaron ser el mecanismo protector efector de esta vacuna, como fue evidenciado por experimentos de transferencia de suero.

Los subtipos de anticuerpos anti-M2e IgG1 e IgG2 han sido asociados con la protección inducida por M2e, ya que ambos son capaces de unirse a FcR γ (148). El subtipo IgG2a se une preferencialmente a FcR γ I, III y IV, mientras que IgG1 solo se une a FcR γ III (147). Estudios previos sobre la inmunogenicidad de M2e usando diversas plataformas de vacunación han mostrado resultados variados con respecto a la predominancia de anticuerpos anti-M2e IgG1 e IgG2a (66, 149-154). En nuestro modelo de vacunación, el subtipo IgG1 fue predominante sobre los anticuerpos IgG2a en ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e, isotipo:M2e o péptido libre M2e. Por lo tanto, es muy probable que la actividad protectora del suero de ratones inoculados con el conjugado α -DEC-205:M2e se debió principalmente a la acción de anticuerpos anti-M2e del subtipo IgG1.

Contrario con nuestros resultados, reportes previos indican que bajo ciertas condiciones experimentales, la protección inducida por M2e depende principalmente de células T CD4⁺ efectoras pro-inflamatorias (125). En nuestro trabajo, cuando a ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e se les eliminó las células T CD4⁺ previo al reto con IAV, la protección inducida por el direccionamiento no disminuyó. El papel de las células T CD4⁺ en nuestro modelo de vacunación podría estar relacionado mayormente a la cooperación en la producción de anticuerpos, ya que la proporción anticuerpos anti-M2e IgG1:IgG2a sugiere que una respuesta Th2 fue predominante durante la fase inductora de la respuesta inmune específica a la vacuna.

En nuestro modelo, altos títulos de anticuerpos anti-M2e séricos se presentaron después de la segunda inmunización con α -DEC-205:M2e, mientras que con el grupo control isotipo:M2e se detectaron niveles bajos de anticuerpos anti-M2e posterior a la tercera inmunización. Estudios previos han mostrado que el péptido M2e contiene epítomos B y T dentro de su corta secuencia (63). De

manera más específica, M2e contiene un epítipo para células T CD4⁺ (70, 125) restringido a la molécula de MHC clase II I-A^d, el cual está presente en el modelo animal usado en este estudio (BALB/c; H-2^d). Por lo tanto, es muy probable que la respuesta de anticuerpos incrementada en ratones inmunizados con α -DEC-205:M2e fue el resultado de una eficiente inducción de células T CD4⁺ específicas de M2e por células dendríticas vía DEC-205 (88), las cuales subsecuentemente cooperaron con células B específicas. Además, el conjugado α -DEC-205:M2e no solo participaría dirigiendo a M2e a DC, también podría estar actuando como un complejo acarreador, el cual puede ser captado por células B a través de su BCR. Después del procesamiento, estas células podrían presentar péptidos derivados de M2e a células T CD4⁺ de memoria en el contexto de moléculas de MHC clase II (**Figura 29**).

En contraste, aunque el conjugado isotipo:M2e podría actuar como un complejo acarreador a células B estimuladas, los títulos bajos de anticuerpos podrían ser explicados por una pobre inducción de células T CD4⁺ de memoria. De acuerdo a esto, Amorim et al mostraron la importancia de tener epítopos B y T dentro de una secuencia peptídica dirigida a DEC-205 con el fin de inducir una respuesta potente de anticuerpos (93), ya que cuando direccionaron el polipéptido MSP₄₂ de *Plasmodium vivax* a DEC-205, el cual contiene epítopos B y T se indujo una potente respuesta de anticuerpos. Por el otro lado, cuando un fragmento de este polipéptido que solo contienen epítopos B (MSP₁₉) se direccionó a DEC-205, no hubo respuesta.

El papel de DEC-205 en células B activadas durante la inducción de altos títulos de anticuerpos séricos en ratones inmunizados con el conjugado α -DEC-205:M2e no puede ser descartado. Aunque las células B expresan niveles bajos de DEC-205 comparado con las DC, su expresión se incrementa en ellas cuando se activan, así como su potencial para capturar y presentar péptidos a células T (155). Además, células B de centro germinal direccionadas con antígeno vía DEC-205 incrementan su

potencial para interactuar con Tfh y, por ende, aumenta la generación de células plasmáticas (156, 157). Por lo tanto, es probable que el conjugado α -DEC-205:M2e no solo estimuló células B a través de sus receptores de antígenos específicos, sino que también lo pudo haber realizado a través de DEC-205, presente en células B activadas, lo que resultó en una incrementada presentación de antígeno a células T CD4⁺ de memoria y generación de células plasmáticas.

Como se mencionó anteriormente, ante una infección natural la respuesta humoral hacia M2e en humanos es pobre, sin embargo en aquellos individuos que presentan anticuerpos séricos (aún bajos), la respuesta aumenta ante una segunda infección, como lo evidenció Zhong et al (158), cuando analizó la respuesta de anticuerpos pre y post pandemia del año 2009, encontrando que individuos con títulos bajos de anticuerpos anti-M2e preexistentes tuvieron una respuesta más potente después de la infección con el virus ocasionante de la pandemia del 2009 (A/H1N1pdm09). Estos anticuerpos tuvieron reactividad cruzada con proteínas M2 de múltiples IAV estacionales. Esto sugiere que una vez establecida la memoria inmune hacia M2e (de células T y B), es muy probable que la respuesta protectora específica sea más eficiente. De acuerdo a nuestro trabajo, el direccionamiento de M2e aumenta la generación de células de memoria, que se evidenció cuando células de bazo de ratones inmunizados y retados con una dosis subletal de virus influenza A/H1N1/New Caledonia/20/99 recuperadas 50 días después de la infección y estimuladas con el péptido M2e, se indujo una respuesta proliferativa más potente que en células procedentes de ratones de grupos control.

Trabajos previos con diferentes estrategias de vacunación basadas en M2e han mostrado que la inmunidad hacia M2e varía entre animales con diferente fondo genético (63). En este sentido, Wolf et al (159) reportó que ratones C57BL/6 (H-2^b), C3H (H-2^k), CD1/ICR, y Swiss Webster inmunizados con una vacuna basada en M2e tuvieron una carga viral significativamente mayor que ratones BALB/c (H-2^d), y esto correlacionó con una respuesta disminuida de anticuerpos y células T en dichos ratones,

comparada con la potente respuesta que se obtuvo con los ratones BALB/c. Estos resultados concuerdan con lo que se obtuvo en el presente trabajo cuando se direccionó M2e a DEC-205 en ratones C57BL/6, en los cuales no hubo respuesta protectora, esto sin duda está relacionado a la ausencia del epítipo CD4 en la secuencia de M2e, el cual está presente en ratones BALB/c, restringido al haplotipo H-2^d. Aunque para este experimento no se evaluó respuesta de anticuerpos, los datos contribuyen a reforzar la hipótesis de Amorim et al(93), de la importancia de tener epítopos T CD4⁺ y B dentro de un antígeno direccionado a DEC-205 para la inducción de anticuerpos específicos, debido a que el mecanismo efector de nuestra vacuna se debe a respuesta humoral específica.

La ruta de administración es importante en el desarrollo de nuevas vacunas, y en nuestro modelo es de particular relevancia debido a los niveles de expresión variables de DEC-205 en diversos subgrupos de DC, a sus distintas localizaciones y a la variedad de funciones biológicas a las que cada subgrupo se especializa. Cuando el anticuerpo conjugado α -DEC-205:M2e se administró por diversas vías (intraperitoneal, subcutánea e intranasal) altos niveles de protección se encontraron en todas ellas. Trabajos previos sugieren que los anticuerpos anti-DEC-205 conjugados con antígeno pueden movilizarse a órganos linfoides periféricos. Bonifaz et al (88) mostró que el anticuerpo α -DEC-205 conjugado con Alexa488 pudo ser encontrado en células dendríticas CD11c⁺CD8⁺ de nódulos linfoides periféricos y bazo después de 6 horas de su inoculación s.c.. Debido a que las células dendríticas de piel no expresan CD8, estos datos sugieren que el conjugado viajó a vía linfa y/o sangre periférica. De manera similar, cuando se inoculó el conjugado α -DEC-205-OVA, el mismo subgrupo de DC pudo teñirse en los mismos órganos linfoides con un anticuerpo anti-OVA.

El ectodominio de la proteína M2 ha sido direccionado hacia otros dos receptores endocíticos de DC (Clec9A y XCR1). El receptor Clec9A se expresa específicamente en el subtipo de DCs convencionales CD8⁺ de ratón, en su equivalente migratorio CD103⁺, y en las DCs CD141⁺ de humano.

El direccionamiento de antígenos a este receptor ha mostrado inducir respuestas potentes de células T citotóxicas, mediante una eficiente presentación cruzada de antígenos en moléculas MHC-I a células T CD8⁺; así como respuestas incrementadas de anticuerpos, por una eficiente presentación de antígenos vía MHC-II, que inducen células Tfh y memoria, inclusive en ausencia de adyuvantes. De manera relevante, Park *et al.*, encontraron que la inmunización de ratones (BALB/c y C57BL/6) con una única dosis de 2 ug de un anticuerpo de rata anti-Clec9A fusionado a 3 moléculas de M2e (equivalente a 0.21 ug de M2e) indujo títulos altos y duraderos (> 42 días post inmunización) de anticuerpos específicos anti-M2e. Interesantemente, en los ratones C57BL/6 que recibieron la vacuna sin adyuvante, se registraron niveles altos de Abs comparables al grupo que recibió CpG como adyuvante. Por el contrario, cuando se direccionó M2e a Clec9A en ausencia de adyuvante se registraron títulos de anticuerpos anti-M2e diez veces menores que los que se registraron con la inmunización con adyuvante. Esta estrategia de direccionamiento resultó en 90% de protección cuando ratones BALB/c se retaron con una dosis letal de virus PR8 (160). El receptor XCR1 también se expresa en células dendríticas convencionales y fue direccionado con M2e por Deloizi *et al* en un modelo de cerdos (161). Los autores encontraron que el direccionamiento de M2e a XCR1 incrementó la respuesta de anticuerpos IgG anti-M2e en ausencia de adyuvante.

Conjuntamente estos resultados sugieren que el direccionamiento de M2e a receptores endocíticos de células dendríticas como DEC-205 es una estrategia eficiente que permite aumentar su inmunogenicidad y podría ser una alternativa para el desarrollo de nuevas vacunas contra IAV.

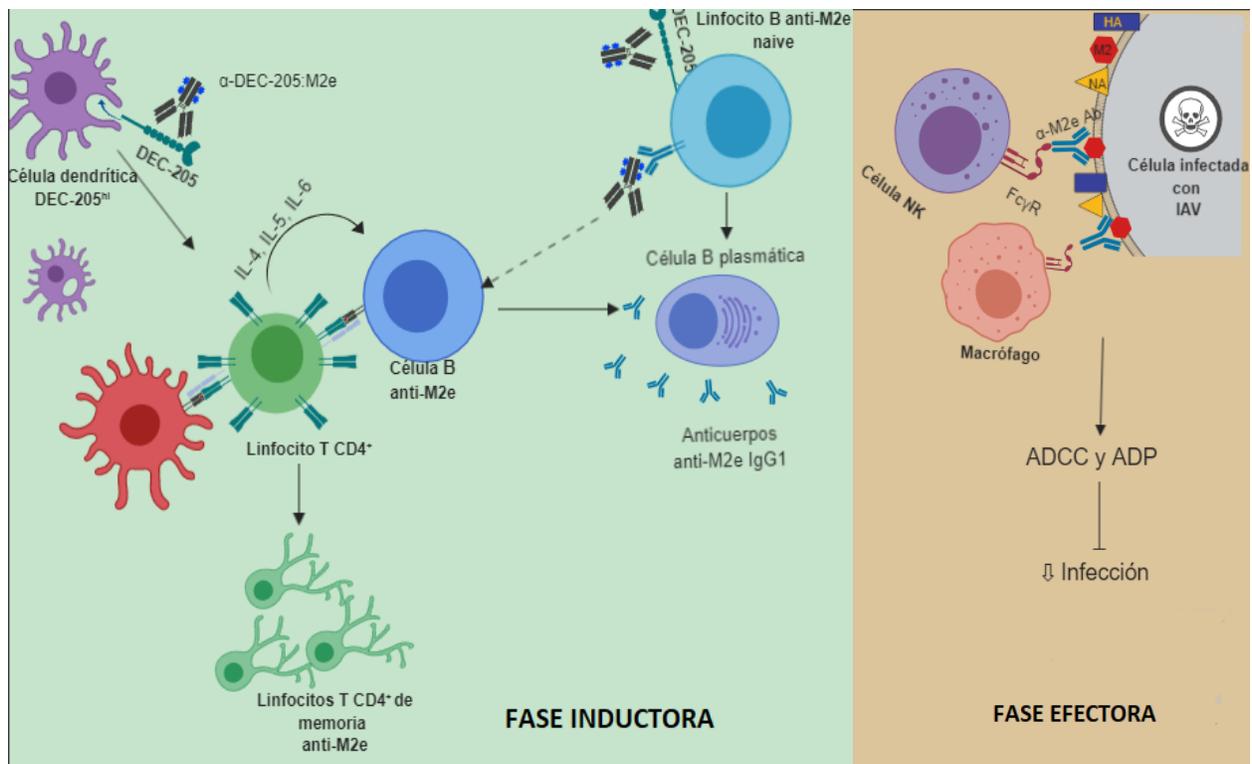


Figura 29. Modelo hipotético propuesto. FASE INDUCTORA. El anticuerpo α -DEC-205:M2e fue internalizado por células dendríticas y M2e presentado a células T CD4+, las cuales cooperaron en la producción de anticuerpos IgG1, mediante la liberación de citocinas Th2. Al mismo tiempo, el anticuerpo conjugado pudo funcionar como un complejo acarreador, siendo reconocido por células B naíve mediante su BCR dando lugar a células B plasmáticas productoras de anticuerpos, o bien presentando M2e a células T CD4+ proveyendo ayuda intermolecular para la generación de anticuerpos. El conjugado también pudo ser captado vía DEC-205 por células B activadas, resultando en una presentación incrementada de M2e a células T CD4+.

FASE EFECTORA. Ante el reto, los anticuerpos IgG1 reconocen M2e en la membrana plasmática de células infectadas, los cuales fueron reconocidos por células NK y macrófagos alveolares vía su receptor Fc γ , limitando la infección por mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADP).

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El direccionamiento de M2e a DEC-205 potenció la respuesta de anticuerpos y generó mayor sobrevida ante retos heterosubtípicos que los ratones que recibieron cinco veces más péptido libre, por lo que parece ser una eficiente herramienta para incrementar respuestas inmunes protectoras, y provee una nueva alternativa para el desarrollo de una vacuna universal heterosubtípica.

Estudios futuros deberán enfocarse a investigar la fase inductora de la respuesta inmune, más que la fase efectora, determinar que subgrupos de DC son las responsables de captar y presentar antígeno a células T, que tipo de respuesta de anticuerpos se promueve cuando se direcciona M2e (folicular vs extrafolicular), el papel de las células B en la captación de antígeno vía DEC-205, duración de la memoria inmune generada (corto o largo plazo), el patrón de citocinas en células Th, la optimización del diseño experimental de la vacuna (número de dosis, curva de antígeno), así como el efecto que tienen otros adyuvantes en la respuesta inmune.

Por otro lado, esta herramienta parece no ser eficiente contra todos los antígenos, como fue evidenciado por experimentos preliminares con el uso de epítomos de células T CD4⁺ y de la vacuna estacional trivalente, sugiriendo que esta herramienta tiene que ser investigada para cada antígeno propuesto. Es necesario confirmar los resultados preliminares con estos epítomos y TIV, y formular nuevas hipótesis basados en ellos. Es probable que la implementación de ciertos epítomos con el uso de ciertos adyuvantes puedan desarrollar un aumento en la patología por la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias, por lo que el uso de nuevos adyuvantes o la implementación de estrategias sin adyuvante podrían ayudar a contestar estas interrogantes, además de generar nuevo conocimiento del mecanismo de acción de vacunas basadas en DEC-205.

ANEXOS

Anexo A. Artículo de investigación original publicado

Vaccine 37 (2019) 2624–2633



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Targeting M2e to DEC-205 induces an enhanced serum antibody-dependent heterosubtypic protection against influenza A virus infection



H.O. Padilla-Quirarte^{a,b}, O. Badillo-Godinez^d, L. Gutierrez-Xicotencatl^d, Y. Acevedo-Betancur^a, J.D. Luna-Andon^a, J.L. Montiel-Hernandez^e, D.V. Lopez-Guerrero^{c,1}, F. Esquivel-Guadarrama^{a,*,1}

^a LIV, Facultad de Medicina, UAEM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^c Facultad de Nutrición, UAEM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^d CISEI-INSP, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^e Facultad de Farmacia, UAEM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2018

Received in revised form 23 January 2019

Accepted 15 February 2019

Available online 5 April 2019

Keywords:

Influenza

M2e

DEC-205

Dendritic cells

Heterosubtypic vaccine

ABSTRACT

The ectodomain of the influenza A virus (IAV) M2 protein (M2e) is highly conserved, and it represents a promising candidate for the development of an “universal vaccine”. However, the low immunogenicity associated to M2e in a natural infection or in response to seasonal vaccines has led to explore new approaches to enhance it. In recent years, it has become clear that targeting antigens to dendritic cells (DC) is an efficient way to enhance immune responses against pathogens. In this work, the M2e peptide was chemically cross-linked to a monoclonal antibody (mAb) specific for DEC-205 (α -DEC-205:M2e), present on DC. BALB/c mice were inoculated subcutaneously (s.c.) three times with the conjugate equivalent to 1 μ g of M2e, in the presence of polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) as adjuvant. As controls, other groups of mice were inoculated under the same conditions with M2e cross-linked to an isotype control mAb (isotype:M2e), 5 μ g of free M2e peptide, ovalbumin (OVA) cross-linked to the α -DEC-205 mAb (α -DEC-205:OVA) or poly I:C alone. Immunization with α -DEC-205:M2e induced high levels of serum antibodies (Abs) compared to isotype:M2e or to free M2e peptide, and in all cases IgG1 was predominant over IgG2a Abs. Furthermore, immunization with the α -DEC-205:M2e conjugate did not prevent morbidity, but it induced up to 76% protection against a heterosubtypic IAV lethal challenge. Contrasting with the 20 to 40% protection induced by isotype:M2e or by free M2e peptide. The protection induced by α -DEC-205:M2e conjugate was dependent on non-neutralizing serum Abs and independent of effector CD4⁺ T cells. These results show that targeting M2e to DEC-205 is a very effective alternative to induce strong heterosubtypic protection against an IAV infection.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Influenza A viruses (IAV) are still a continuous threat to public health. Every year, up to half a million deaths are caused by seasonal strains, and there is always a potential risk that a new strain emerges, causing a pandemic. Even though there are seasonal vaccines, they must be reformulated annually, and their efficacy depends on a good prediction of circulating strains every season. On the other hand, immunity against pandemics could be nonexistent or poor, depending on the characteristics of the new strain [1].

* Corresponding author at: Laboratorio de Inmunología Viral, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Calle Itzacchuatl, Esq. Leñeros, Col. Volcanes Cuernavaca, Morelos C.P. 63250, México.

E-mail address: fernando.esquivel@uaem.mx (F. Esquivel-Guadarrama).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.050>
0264-410X/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The idea of a “universal vaccine,” which could induce protection against all subtypes of IAV, has been raised by many research groups around the world. The ectodomain of matrix-2 protein (M2e), which is highly conserved among IAV (particularly among viruses with the same host restriction), has been proposed as an important target antigen to this effect [2,3].

The M2 protein of IAV is a channel-shaped homotetrameric type III protein, which traverses the virion from outside to inside. This protein has three domains: a C-terminal cytoplasmic domain (54 aa), a transmembrane domain (19 aa), and a short N-terminal domain of M2e (M2₁₋₂₄) located on the outside of the virion (ectodomain), and has > 90% aa identity among influenza isolates [4]. M2 plays an active role during the entry phase of IAV, allowing the entrance of protons to the virion core and causing the dissociation of viral ribonucleoproteins (vRNPs) from capsid protein M1

and their subsequent release into the cytoplasm [5]. Moreover, M2e balances the pH in the *trans*-Golgi network (TGN), thus preventing an early hemagglutinin (HA) membrane fusion conformation [6].

Experimental data have revealed that M2e can induce protective heterosubtypic immune responses. Even though M2e-specific-Abs are non-neutralizing, they can help eliminate infected cells by recognizing M2e on their surface. They engage macrophages or NK cells via Fc γ receptors, promoting phagocytosis and/or antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) [7–9]. Furthermore, several studies have reported specific T cell epitopes (CD4 and CD8) within M2e, which may contribute to the protection [10–13].

However, immunogenicity to M2e is very poor within the course of a natural IAV infection, and specific Abs are inefficient in recognizing the few molecules present on the virion membrane (about 16), due to the steric hindrance exerted by major membrane glycoproteins [HA and neuraminidase (NA)] [14]. To overcome this, M2e-based vaccines have been tested in different animal models (mice, ferrets, and rhesus monkeys). Different approaches have also been tried to increase its immunogenicity, like coupling it to carrier proteins [2], including it in virus-like particles (VLPs) [15], codifying it in DNA vaccines [16], and using a variety of adjuvants. In general, these vaccines have been shown to induce high levels of heterosubtypic protection.

In this context, targeting antigens to antigen-presenting cells (APC), and especially to DC, is a strategy that could be used to boost cellular and humoral immunity to M2e. On their surface, DC are equipped with endocytic receptors, which promote antigen internalization and the subsequent processing and presentation to T cells. These features have been used for designing experimental vaccines that potentiate immunogenicity against particular antigens, when they are linked to receptor-specific mAbs, thus optimizing their delivery to DC [17].

Among these receptors, DEC 205 is particularly attractive for DC-based vaccines. DEC-205 is a C-type lectin predominantly expressed on the surface of skin DC and with a minor expression reported on B cells, NK cells, T cells and plasmacytoid DC (pDC) [18,19]. It appears that the main biologic role of DEC-205 is to promote tolerance by sensing apoptotic cells and the subsequent presentation of self-antigens to T cells [20,21]. However, when the antigen is targeted to this receptor coupled to mAbs in the presence of adjuvant, the delivery and the potential presentation of DC to CD4 T cells (via MHC-II) or the cross-presentation to CD8 cells (via MHC I) are greatly enhanced, with minimal quantities of antigen compared to a non-targeted antigen. Furthermore, evidence suggests that targeting antigens to DEC-205 through parenteral immunization leads to strong and protective T-cell mucosal responses, which is particularly relevant for the design of vaccines against viruses that infect mucosa [21,22]. Moreover, under experimental conditions, activated B cells are capable of presenting antigen to T cells via DEC-205 as efficiently as DC. On the other hand, germinal center (GC) B cells targeted via DEC-205 increase their potential to interact with follicular helper T cells (T_{fh}), and they generate plasma cells or reenter the dark zone of the GC for further proliferation and maturation [23,24].

The aim of this work was to investigate whether targeting the M2e peptide, which contains epitopes of both B and T cells, to DC via DEC-205 could improve its immunogenicity compared to M2e-free peptide. We found that M2e targeted to DEC-205, in the presence of adjuvant, greatly enhanced the heterosubtypic protection against an IAV infection compared to M2e-free peptide or M2e peptide conjugated to an isotype control mAb. We also found that this protection was dependent on non-neutralizing serum antibodies but independent of effector CD4⁺ T cells.

2. Material and methods

2.1. Mice

Specific-pathogen-free, 4 to 8 weeks old female BALB/c mice were provided by the Biotechnology Institute (IBT, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico). For experimental procedures, mice were housed either in the IBT or in the Faculty of Medicine (UAEM, Cuernavaca, Morelos, Mexico) under standard light/dark cycle (12 h/12 h) and provided with food and water *ad libitum*.

2.2. Cells

Madin-Darby canine kidney cells (MDCK; ATCC CCL-34) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 U/mL penicillin/100 μ g/mL streptomycin (GIBCO). The hybridomas NLDC145 (rat anti-mouse DEC-205, IgG2a), III-10 (control of rat isotype, IgG2a), GK1.5 (rat anti-mouse CD4, IgG2b) (ATCC TIB-207) and M2-1C6-4R3 (mouse anti-M1 of influenza, IgG1; ATCC HB64) were maintained in RPMI medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine and 20 μ g/mL gentamycin (GIBCO). The hybridomas NLDC145 and III-10 were kindly donated by Ralph Steinman's group (Laboratory of Cellular Physiology, The Rockefeller University, New York) [25]. DCs were derived from 9 to 12 days cultures of mouse bone marrow cells in the presence of GM-CSF (Invitrogen), as previously described [22].

2.3. Viruses

Influenza virus A/H1N1/New Caledonia/20/99 and A/H3N2/NT/60/68 were kindly donated by Carlos Arias (IBT, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico) and Jack Bennink and Jonathan Yewdell (Laboratory of Viral Immunology, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland), respectively. Viruses were expanded *in vitro* in MDCK cells, or in 10 days old chicken embryos (Alpes, Mexico) infected and incubated for 48 h at 34 °C. For *in vivo* infections, viruses were adapted to mouse by serial passages (14 times) in BALB/c mice as previously described [26,27]. Cell lysates, allantoic fluid, and lung homogenates were aliquoted and stored at –80 °C until their use.

2.4. Peptides and antibodies

Peptides derived from a consensus human virus sequence of M2e (aa 1–24; MSLLEVEVETPIRNEWGCRNDSSD) [14] and a B cell epitope from HA of A/H1N1/New Caledonia/20/99 virus (aa 331–355; VTGLRNIPSIQSRGLFGAIGFIEG; HA_{331–355}) were synthesized by EZbiolab (Carmel, CA). Hybridomas producing mAbs α -DEC-205, isotype control III-10, anti-CD4 and anti-M1 of influenza were cultured, and the mAb present in the supernatants was purified as previously described by Badillo-Godinez et al. [22]. A polyclonal anti-influenza virus Ab was produced in rabbit by immunizing with a mixture of the influenza viruses A/H1N1/New Caledonia/20/99 and A/H3N2/NT/60/68 (anti-FLU). A homemade mouse anti-OVA polyclonal Ab was described previously [22]. Anti-influenza M2e mAb 14C2 (IgG1) was purchased from ABCAM. The polyclonal secondary antibodies rabbit anti-rat IgG (Sigma), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG1 and IgG2a-HRP (Zymed), goat anti-mouse IgG-HRP (Jackson Immuno Research) and goat anti-rabbit IgG-HRP (Dako) were used for different experimental procedures. For flow cytometry, the mAb anti-mouse CD11c (HL3)-biotin, streptavidin conjugated to APC or FITC and polyclonal goat anti-mouse IgG-FITC were

acquired from Biologend; polyclonal goat anti-rat IgG-Alexa 488 antibody was from Life Technologies.

2.5. Virus titration

Focus-forming units (ffu) were evaluated in lung homogenates infected with IAV. Homogenates were serially diluted in DMEM medium containing 1 µg/mL of L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone (TPCK)- treated trypsin (Sigma), and 100 µL of each dilution was used to infect MDCK-cell monolayers in 96-well plates for 1 h at 37 °C. After this time, infection medium was replaced with fresh DMEM and incubated for 16 h at 37 °C. Cells were fixed with 80% acetone in PBS and incubated with a rabbit anti-FLU polyclonal Ab for 1 h at 37 °C. Cells were washed and a goat anti-rabbit IgG-HRP polyclonal Ab was added as secondary Ab and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, the substrate (3-amino-9-ethyl carbazole in 0.1 M acetate buffer; Sigma) was added and after 5 min at room temperature, plates were washed with distilled water. Infection foci were counted on light microscopy and expressed as ffu/mL. The lethal dose 50 (LD₅₀) of lung homogenates in mice was performed following the Reed Muench's method described elsewhere [28].

Plaque forming units (pfu) were evaluated in allantoic fluid infected with IAV. Allantoic fluid was 10-fold-diluted in DMEM medium containing 1 µg/mL of TPCK-treated trypsin, and 1 mL of each dilution was used to infect MDCK-cell monolayers in 6-well plates for 2 h at 37 °C. After this time, infection medium was discarded and 3 mL of 0.5% agar noble (Difco) in DMEM medium supplemented with penicillin/streptomycin and 1 µg/mL of TPCK-treated trypsin was overlaid to the cells. After 2–3 days of incubation at 37 °C, 1.5 mL of paraformaldehyde 2% in PBS was added to each well for 2 h at room temperature. After washing with PBS, fixed cells were stained with 1% crystal violet in ethanol for 5 min, washed with distilled water and infection plaques were counted under an inverted microscope. The infection plaques were expressed as pfu/mL.

2.6. Chemically cross-linking of monoclonal antibodies with M2e or OVA

Monoclonal antibodies were cross-linked with antigen as previously described [22]. Briefly, the mAbs α-DEC-205 and its isotype control were individually activated with succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (Pierce); while M2e peptide and ovalbumin (Sigma) were independently activated with Traut's reagent (2-iminothiolane) (Pierce). After this process, mAbs and antigens were dialyzed separately (except for the short M2e peptide) and mixed (1:1) for two days at 4 °C. After this time, the non-bound antigen was removed passing cross-linked mAbs for a 100 kDa-ultra-centrifuge filter (Amicon). The resulting conjugates, α-DEC-205:M2e, isotype:M2e and α-DEC-205:OVA were subjected to SDS-PAGE, Western blot and dot blot analysis.

2.7. Western blot

To confirm that antibodies were cross-linked with antigens, and in order to include free M2e peptide (2.7 kDa) as control for the anti-M2e mAb, they were resolved in a 10/15% SDS-PAGE. To this end, a third of the total volume was loaded with 15% acrylamide and on top the rest of the volume with 10% acrylamide. Samples were resolved under non-reducing or reducing conditions, using 144 mM 2-Mercaptoethanol (2-ME), and transferred to nitrocellulose membranes (Perking Elmer) for 1 h at 200 V, using a Mini-Trans blot (Bio-Rad). Membranes were blocked with blocking buffer (5% fat-free milk and 0.05% Tween-20 in PBS) for 1 h at room temperature. After washing with 0.05% Tween-20 in PBS, the

membranes were incubated for 1 h at 37 °C with a polyclonal Ab rabbit anti-rat IgG or with a mouse anti-M2e mAb (14C2) diluted 1:1000 in blocking buffer. The membranes were washed and a secondary polyclonal Ab goat anti-rabbit IgG-HRP or goat anti-mouse IgG1-HRP diluted in blocking buffer 1:2500 were added and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, Luminol (Perking Elmer) was added to each membrane to develop signal and captured with an Odyssey Fc (LI-COR).

2.8. Slot blot

To calculate the amount of peptide M2e bound to antibodies (α-DEC-205:M2e and isotype:M2e) a slot blot assay was performed. Serial dilutions of M2e and the HA₃₃₁₋₃₅₅ peptide, as well as conjugates, were immobilized in a nitrocellulose membrane using the Hybri-Slot Manifold (Biometra). The membranes were treated with the Western blot procedure previously described, using the mAb mouse anti-M2e (14C2) as primary antibody and the polyclonal Ab goat anti-mouse IgG1-HRP as secondary Ab. The amount of M2e peptide bound to the conjugates was extrapolated from the standard curve of free M2e peptide. The HA₃₃₁₋₃₅₅ peptide was used as negative control.

2.9. Immunization and challenge

Groups of 4–6 mice were inoculated s.c. three times, 3 weeks apart with one of the following treatments: α-DEC-205:M2e, isotype:M2e or α-DEC205:OVA with the equivalent of 1 µg of antigen, 5 µg of free peptide M2e, or PBS alone, all in presence of 50 µg of poly I:C (Amershan BioSciences) as adjuvant. Before each immunization (days 0, 21 and 42), mice were bled to analyze levels of anti-M2e antibodies in sera. Two weeks after the third immunization (day 57), mice were anesthetized with isoflurane (Soflorane Vet, PISA Laboratory) and intranasally (i.n.) challenged with 50 µL of PBS containing 30LD₅₀ of IAV H3N2/NT/60/68 or H1N1/New Caledonia/20/99. Morbidity (weight loss) and mortality were monitored daily for 10 days. For ethical reasons, mice that lost more than 25% of their initial weight were euthanized and considered an influenza-related death.

2.10. Elimination of CD4⁺ T cells

For evaluating the role of effector CD4⁺ T cells on protection against IAV lethal challenge, immunized mice with α-DEC-205:M2e were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 2.5 mg of purified anti-CD4 mAb GK1.5 on days -3, 0 and +3 with respect to the challenge day with IAV. This treatment induced above 90% depletion of CD4⁺ T cells in the spleen as determined by flow cytometry (data not shown). Mortality of mice was scored as indicated above.

2.11. Passive transfer of serum

Naïve mice were transferred with 350 µL of pooled sera from mice immunized with α-DEC-205:M2e (post third immunization), or pooled sera from control mice inoculated with PBS plus adjuvant (mock sera). Mortality of mice was scored as indicated above.

2.12. Detection of M2e-specific serum antibodies by ELISA

High binding 96-well plates (Costar) were coated with 400 ng per well of the M2e synthetic peptide, diluted in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), overnight at 4 °C. Then, wells were blocked with blocking buffer (5% w/v fat-free milk in PBS/0.05% Tween-20) for 2 h at room temperature. After this, a pool of sera from immunized mice was diluted 1:200 for screening Ab levels regarding each immunization, or 1:500 to 1:128,000 for titration purposes, in

blocking buffer and 50 μ L of the dilutions added per well and incubated for 2 h at 37 °C. Plates were washed with PBS/Tween-20 0.05% and 50 μ L of secondary Ab goat anti-mouse IgG-HRP (1:2500), rabbit anti-mouse IgG1-HRP (1:500) or rabbit anti-mouse IgG2a (1:500) diluted in blocking buffer was added and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, 50 μ L of substrate (*o*-phenylenediamine; Sigma) was added and incubated for 15 min at room temperature. The reaction was stopped with H₂SO₄ 2 M and plates were read at 492 nm in a 96-well plate spectrophotometer (BIOTEK, Instruments).

2.13. Influenza virus neutralization assay

Levels of neutralizing antibodies against IAV in experimental sera were analyzed by an ELISA-based antigen reduction neutralization assay (NELISA). A pool of sera from immunized mice or rabbit anti-FLU polyclonal antibody were 2-fold serially diluted with DMEM in 96-well plates, and 50 μ L of each dilution was mixed with 50 μ L of DMEM containing 100 pfu of IAV H1N1/New Caledonia/20/99 (allantoic fluid). After 1 h of incubation at 37 °C, the mixture was added to a monolayer of MDCK cell in tissue culture flat-bottomed 96-well plates, and incubated for 1 h at 37 °C. After this time, the inoculum was replaced with fresh DMEM with 1 μ g/mL TPCk-treated trypsin and incubated for 18–20 h 37 °C. Plates went through three cycles of freezing and thawing and the viral load in the cell lysates determined by a sandwich ELISA assay. For this end, high binding 96-well plates were coated with rabbit anti-FLU polyclonal Ab (1:8000) in PBS overnight at 4 °C. Wells were blocked with blocking buffer for 2 h at room temperature and 50 μ L of the cell lysates added and incubated for 1 h at 37 °C. Plates were washed and 50 μ L of mouse mAb anti-IAV M1 diluted in blocking buffer (1:100) was added and incubated for 1 h at 37 °C. Finally, 50 μ L of rabbit anti-mouse IgG1-HRP (1:500) diluted in blocking buffer was added and incubated for 1 h at 37 °C. Substrate addition and the plate reading was done as indicated above for the anti-M2e peptide ELISA.

2.14. Flow cytometry

Bone marrow-derived DCs were collected and washed twice with binding buffer (BB; 0.01% sodium azide, 2 mM EDTA, and 2% FBS) containing 2% of rabbit serum (for blocking Fc receptors), resuspended in the same buffer and incubated for 30 min at 4 °C. Cells were washed with BB, resuspended in 100 μ L of BB containing the mAbs anti-CD11c-Biotin and α -DEC-205 and incubated for 20 min at 4 °C. After washing, cells were resuspended in 100 μ L of BB containing streptavidin-APC, and a goat anti-rat IgG-Alexa 488 polyclonal Ab and incubated for 20 min at 4 °C. Finally, cells were washed, fixed with 100 μ L of 2% paraformaldehyde at room temperature for 20 min and 10,000 cells per sample were acquired and analyzed with a FACS Aria-II flow cytometer (Beckton Dickinson). Gating analysis was done with Flow Jo Software (Tree Star, Inc). When the α -DEC-205 conjugates were used, they were followed by a mouse anti-M2e mAb or a mouse anti-OVA polyclonal Ab and a goat anti-mouse IgG-FITC polyclonal antibody, following the protocol described above.

2.15. Statistical analysis

One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison tests, and the Fisher's exact tests were performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla CA). Differences in *p* values equal or minor to 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of mAbs cross-linked to antigen

Rat mAbs antibodies α -DEC-205 and the isotype control were purified from cultures of hybridomas NLD145 and III-10 respectively, and afterward, they were chemically cross-linked to the synthetic peptide M2e or OVA, as an irrelevant antigen. Free mAbs, free M2e peptide, and the conjugates were resolved in a 10/15% SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions and analyzed by Western blot using an anti-rat Ab. As expected, the unconjugated α -DEC-205 mAb gave a major band of 150 kDa, whereas α -DEC-205:M2e and isotype:M2e showed two predominant bands: one of around 150 and the other of 180 kDa (Fig. 1A, top). When an anti-M2e mAb was used, both bands were also detected (Fig. 1A, bottom). Although it is not shown here, α -DEC-205:OVA showed two bands of 150 and 195 kDa: the first one corresponding to the free antibody and the second one to the antibody conjugated to one molecule of OVA, as previously reported [22]. These results indicate that antibodies were successfully cross-linked to the antigens, but in the case of α -DEC-205 and the isotype control, the cross-linking to M2e turned out to be heterogeneous. The band of around 150 kDa appeared to be composed of the mAb cross-linked to few M2e peptides, although the presence of free mAb could not be discarded, and the band of 180 kDa was likely to represent the mAb cross-linked to approximately 12 molecules of the peptide. When samples were resolved under reducing conditions and developed with anti-Rat Ab, a complete reduction was observed with the α -DEC-205 mAb since only two bands of 25 and 55 kDa corresponding to the light and heavy chain, respectively, appeared (Fig. 1A, top).

On the other hand, the reduced conjugates generated the 25 and 55 kDa bands, as well as other bands around 130–160 kDa, disappearing the band around 180 kDa, suggesting that the conjugates were not reduced completely. When the anti-M2e mAb was used a similar pattern was observed but with a new discrete band of around 2.7 kDa corresponding to free M2e (Fig. 1A bottom). These results indicate that, as expected, the thioether bond between the mAb and the peptide is highly resistant to reducing agents and that the cross-linked peptide maybe protecting the disulfide bonds of the heavy and light chain. However, it is clear that both the light and the heavy chains can be cross-linked with at least one M2e peptide. Using a dot-blot analysis, it was possible to determine that the M2e peptide represented from 4% to 10% of the total mass of the conjugates (Fig. 1B).

To determine whether conjugates maintained their specificity to DEC-205, BM-derived DC were stained with mAbs against CD11c, α -DEC-205, α -DEC-205:OVA and α -DEC-205:M2e or isotype:M2e conjugates, and analyzed by flow cytometry. The α -DEC-205 mAb was found to stain about 27% of the DC when an anti-rat polyclonal Ab was used (Fig. 1C). A similar percentage of DC was stained with the α -DEC-205:OVA conjugate followed by an OVA-specific polyclonal Ab or with the α -DEC-205:M2e conjugate followed by an M2e-specific mAb. Isotype:M2e stained only at background levels. In this way, although both chains the α -DEC-205 mAb can be cross-linked with the M2e peptide, it does not have a significant effect on the specificity of the mAb to DEC-205.

3.2. Targeting M2e to DEC-205 induced an enhanced immune response compared to free M2e

To evaluate the immunogenicity of the conjugate, mice were inoculated three times s.c. with α -DEC-205:M2e, equivalent to 1 μ g of the M2e peptide, in the presence of poly I:C as adjuvant.

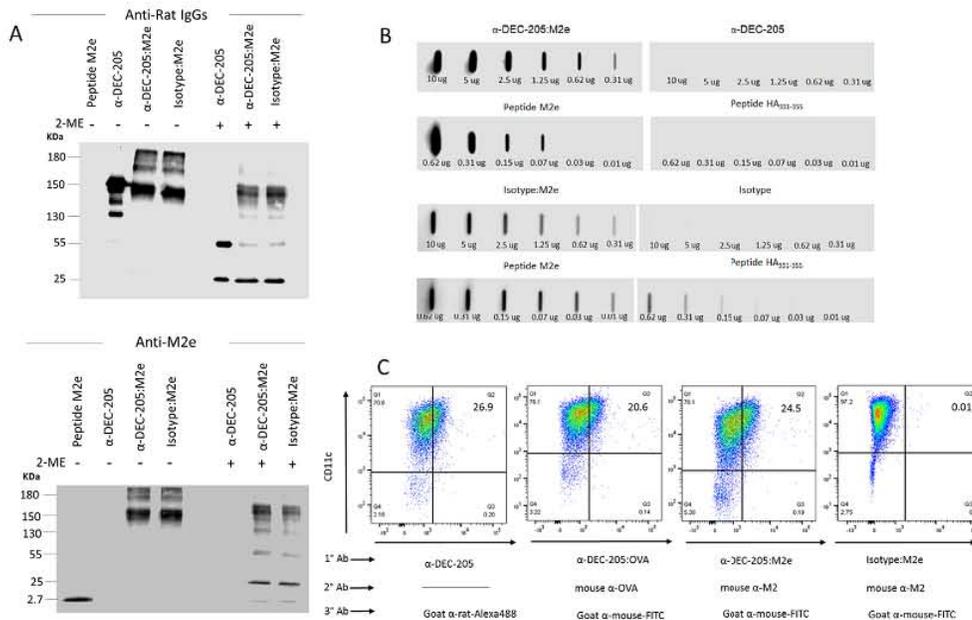


Fig. 1. Characterization of mAbs conjugated with antigen. Peptide M2e and OVA were conjugated to α -DEC-205 mAb, while isotype control was conjugated only to M2e. (A) Cross-linked mAbs were resolved in a 10/15% acrylamide gel under reducing and non-reducing conditions and analyzed by Western blot. (top) The membrane was treated with rabbit anti-rat IgG polyclonal Ab followed by a goat anti-rabbit-IgG polyclonal Ab-HRP; (bottom) The membrane was treated with a mouse anti-M2e mAb (14C2) followed by goat anti-mouse IgG1 polyclonal Ab-HRP. Signal was developed by chemiluminescence. The presence or absence of 2-ME is indicated above each lane with symbols (+ and -, respectively). (B) Serial dilutions of Abs α -DEC-205:M2e or α -DEC-205 alone (top) and isotype:M2e or isotype alone (bottom) were immobilized onto a nitrocellulose membrane that was treated with the mouse anti-M2e mAb (14C2) followed by a goat anti-mouse IgG1 polyclonal Ab-HRP. The amount of M2e peptide bound was extrapolated from the standard curve of free M2e peptide, and the HA₃₃₁₋₃₅₅ peptide was used as a negative control. Signal was developed by chemiluminescence and analyzed with the *ImageJ* software. (C) Bone marrow-derived DCs were used to verify the specificity of the α -DEC-205 conjugates by flow cytometry. Bone marrow-derived DCs were double stained with a mAb anti-CD11c-Biotin (followed by streptavidin-APC) and a μ g of α -DEC-205 or its conjugates. α -DEC-205 was detected with an anti-rat IgG polyclonal Ab-Alexa 488. α -DEC-205:M2e and isotype:M2e were detected with a mouse anti-IgG1 mAb (14C2) followed by a goat anti-mouse IgG polyclonal Ab-FITC. α -DEC-OVA was detected with a mouse anti-OVA polyclonal Ab followed by a goat anti-mouse IgG polyclonal Ab-FITC.

As controls, mice were inoculated with 5 μ g of free M2e peptide, isotype:M2e, α -DEC-205:OVA or PBS, also in the presence of adjuvant (Fig. 2A). The level of the anti-M2e IgG Abs was evaluated three weeks after each inoculation (at a fixed serum dilution of 1:200). The α -DEC-205:M2e conjugate was found to induce high levels of antibodies after the second inoculation. In contrast, free M2e peptide and the isotype:M2e conjugate induced antibodies only after the third inoculation (Supplementary Fig. 1). However, when the titer of the total anti-IgG antibody was analyzed after the third immunization, the α -DEC-205:M2e conjugate generated up to 10 times more antibody than the controls, and the IgG1 Abs were highly predominant over the IgG2a Abs (Fig. 2B). These results show that targeting the M2e peptide to DEC-205 induces a higher IgG antibody response than the free M2e peptide and, since the IgG1 subtype is predominant, it suggests that a higher Th2-type response is induced.

To determine whether the α -DEC-205:M2e conjugate could induce a heterosubtypic protection against the IAV infection, mice were immunized as described above. Two weeks after the last inoculation, mice were infected with a lethal dose of the IAV New Caledonia/H1N1 or NT/60/H3N2. Mice were found to show the same morbidity (evaluated as body weight loss) as the controls (Fig. 3A). However, the mice immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate showed significant higher heterosubtypic protection

levels against mortality than the controls (Fig. 3B and C). Mice immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate showed up to 76% of survival after being infected with the IAV New Caledonia/H1N1 or NT/60/H3N2, compared to a 20% to 40% survival among mice immunized with the free M2e peptide or the isotype:M2e conjugate. Mice inoculated with the α -DEC-205:OVA conjugate or PBS did not show any protection. These results indicate that the α -DEC-205:M2e conjugate does not prevent morbidity, but it does potentiate heterosubtypic protection against mortality, in comparison with the free peptide or the isotype:M2e conjugate.

3.3. Anti-M2e serum antibodies protect against the infection unlike effector CD4⁺ T cells

Previous studies have shown that the protective immune response induced by the M2e peptide is mainly mediated by serum Abs [29–31], although effector CD4⁺ T cells have also been implicated [11]. In order to determine whether the serum Abs are responsible for the protection observed, mice were immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate, and two weeks after the third inoculation, the sera were collected and transferred to naïve mice, followed by a lethal challenge of the IAV NT/60/H3N2. As positive controls, mice immunized with the conjugate were used. As negative controls, naïve mice were transferred with serum from mice

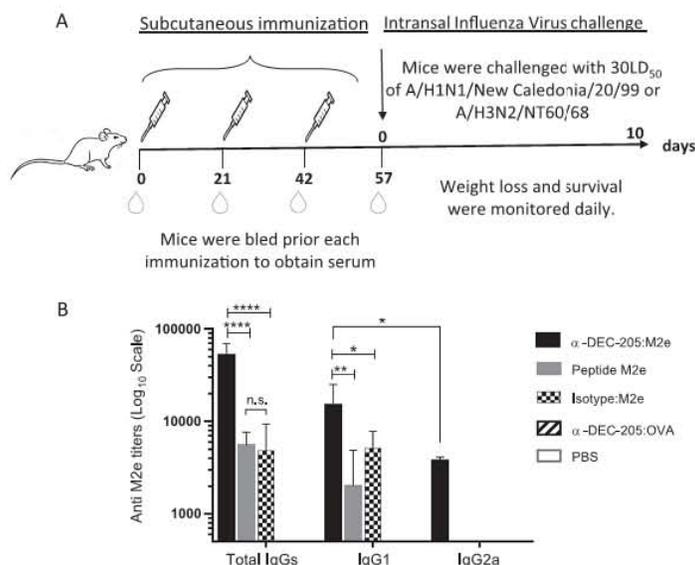


Fig. 2. Experimental design and anti-M2e Abs titers. (A) Experimental design for the scheme of vaccination, blood sampling, and IAV challenge. (B) Anti-M2e serum Abs titers. Post-third immunization sera (day 57) from vaccinated mice of every experimental group were pooled and serially diluted in PBS (1:500 to 1:128,000) and tested by ELISA for detecting specific M2e serum antibodies, as described in material and methods. Ab titers were expressed as the half-maximal value of absorbance of each experimental curve and represented as the mean \pm SD of two independent experiments (each with 6 mice per group). Statistically significant differences are symbolized as *p* values (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001).

inoculated only with poli I:C or left untreated. Only the naïve mice transferred with serum from immunized mice with α -DEC-205:M2e were found to present a similar survival level as mice immunized with the same conjugate (Fig. 4). As expected, the serum antibodies from mice immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate were non-neutralizing in an *in vitro* assay (Supplementary Fig. 2). To determine whether the CD4⁺ T cells were also involved in the protection as effector cells, mice immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate were depleted of this cell population with the mAb GK 1.5 and challenged with a lethal dose of the IAV NT/60/H3N2. As positive controls, mice without mAb treatment were immunized with the conjugate, and as negative controls, naïve mice were used. CD4⁺ T cells were found not to have a role in the protection as effector cells since the immunized mice treated with the mAb showed similar levels of protection as the immunized mice without treatment (Fig. 5). These results indicate that the protection induced by the α -DEC-205:M2e conjugate is dependent on non-neutralizing serum Abs and independent of effector CD4⁺ T cells.

4. Discussion

Seasonal IAV is responsible for half a million deaths annually, and there is a continuous concern that totally new strains emerge due to their mechanisms of evolution, causing worldwide pandemics. Despite the existence of seasonal vaccines, their efficacy depends on the accuracy of the selection of the IAV strains every year, and they may have little or no impact on pandemic viruses [1]. Consequently, interest in developing a heterosubtypic “universal vaccine” that could protect against any IAV strains, using highly conserved antigens along with strategies to increase their immunogenicity, has arisen.

In this study, the poorly immunogenic but highly conserved 24 aa ectodomain of M2 (M2e) from the IAV was targeted to DEC-205 (present mainly in DC), in the presence of poli I:C as adjuvant, in order to enhance its immunogenicity in a mouse model. To this end, M2e was chemically cross-linked to an α -DEC-205 specific mAb or to isotype control. This approach did not prevent morbidity, but it did induce up to 76% survival against a heterosubtypic lethal challenge when minimal quantities of M2e were targeted to DEC-205 (3 μ g/mouse delivered in three doses). This contrasts with the 20% to 40% protection achieved in mice receiving the equivalent amount of M2e conjugated to isotype control or five times as much free M2e peptide. It is worth noting that the cross-linking of the M2e peptide to both chains of the α -DEC-205 mAb did not alter the capacity of the mAb to recognize DEC-205 on the surface of DC. The protection was dependent on non-neutralizing serum antibodies and independent of effector CD4⁺ T cells.

DEC-205 is highly expressed on the surface of DC, and its function is to internalize antigens and deliver them to endosomes containing major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, promoting their presentation to CD4⁺ T cells or cross-presentation to CD8⁺ T cells in the context of the MHC class I molecules. Therefore, targeting antigens to DEC-205 has been used mostly to induce T cell responses, either inflammatory for infectious diseases (with adjuvant) or tolerogenic for autoimmune diseases (without adjuvant) [21,22,25,32–38]. However, several studies have shown that targeting antigens to DEC-205 can induce an enhanced protective antibody response [39–42].

Ab levels against M2 are low or absent in response to the IAV infection in humans [14], and their role in protecting against a natural infection has yet not been elucidated. However, based on experimental studies of several M2e-based vaccination approaches

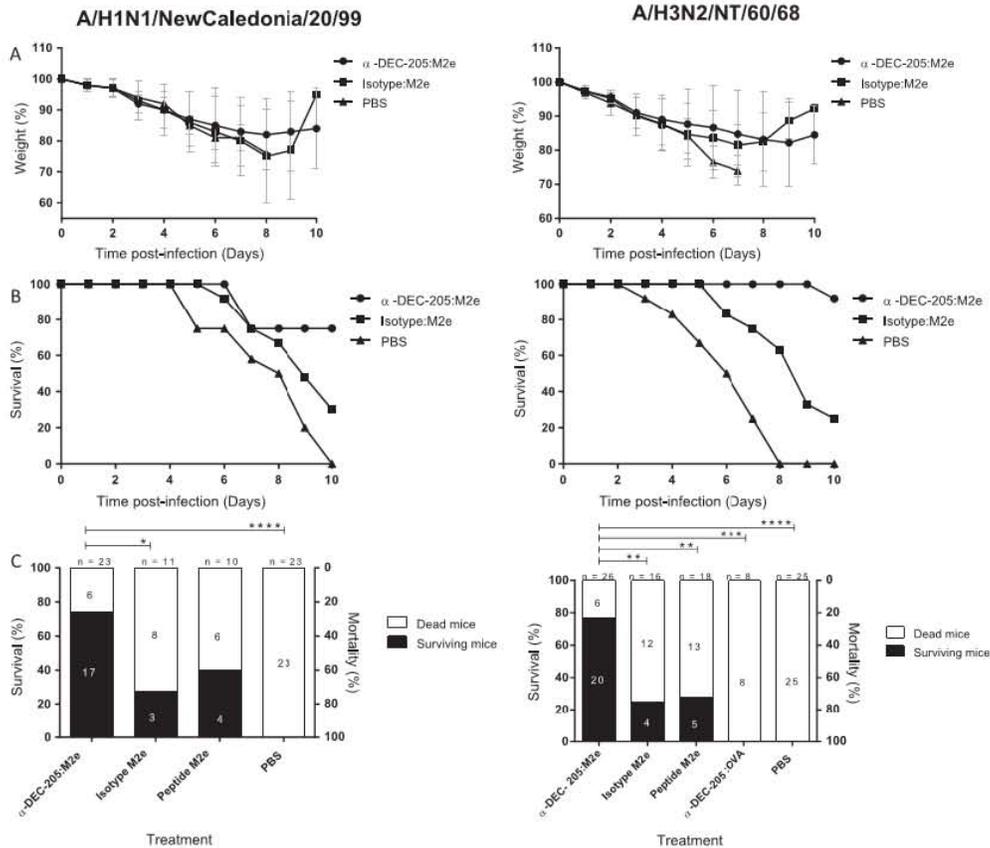


Fig. 3. Targeting M2e to DEC-205 enhances heterosubtypic protection against Influenza A Viruses. Immunized mice were challenged i.n. with 30LD₅₀ of A/H3N2/NT/60/68 or A/H1N1/New Caledonia/20/99 on day 57 according to the scheme of vaccination. Weight loss (A) and survival (B) percentage curves were constructed with data of two independent experiments (each with 6 mice per group). Vertical bars indicate the standard deviation of the mean of weight each day for every experimental group. (C) Overall survival of 2 to 5 experiments against IAV H1N1/New Caledonia/20/99 (left) and H3N2/NT/60/68 (right), represented as cumulative absolute numbers of surviving and non-surviving mice, graphed in stacked bars normalized to 100%. Statistically significant differences are symbolized as p values (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001).

in animal models, it has been determined that specific M2e-Abs are extremely cross-reactive, and they induce high levels of protection against multiple influenza strains [30]. Although M2e-Abs are non-neutralizing, they contribute to the protection by binding to the M2 exposed on the surface of infected cells and by cooperating with macrophages and NK cells via their Fcγ receptors (FcγR) [7,8,43,44]. Accordingly, targeting M2e to DEC-205 in our work significantly increased the production of specific anti-M2e IgG serum antibodies, and, as expected, they were non-neutralizing *in vitro*. Nonetheless, M2e-Abs turned out to be the critical protective effector mechanism of this vaccine, as evidenced by serum transference experiments.

Ab subtypes IgG1 and IgG2a have been associated with the protection induced by M2e since both subtypes are able to bind FcγR [7]. IgG2a can bind FcγR1, III, and IAV, whereas IgG1 only binds FcγRIII [43]. Previous studies on the immunogenicity of M2e using different vaccine platforms have shown variable results with respect to the predominance of IgG1- and IgG2a-M2e specific

Abs [10,45–50]. In our model, anti-M2e IgG1 Abs were predominant over IgG2a antibodies in mice inoculated with the α-DEC-205:M2e conjugate, isotype control or with free M2e peptide. Therefore, it is likely that the protective activity of the serum from mice inoculated with the α-DEC-205:M2e conjugate was due mainly to the action of the anti-M2e IgG1 Abs. Thus, it would be expected that the 20–40% protection observed in mice inoculated with isotype:M2e or with free M2e peptide was also due the anti-M2e IgG1 Abs, as they presented very low levels of anti-M2e IgG2a Abs. In fact, in preliminary results (data not shown), we found that sera from these mice can also induce protection against IVA infection in naïve mice.

Contrary to our results, previous reports have indicated that, under certain conditions, the protection induced by M2e depends mainly on pro-inflammatory effector CD4⁺ T cells [11]. The ratio IgG1: IgG2a found in our study suggests that a Th2-type response was predominant compared to a pro-inflammatory Th1-type response. This could explain the fact that the protection against

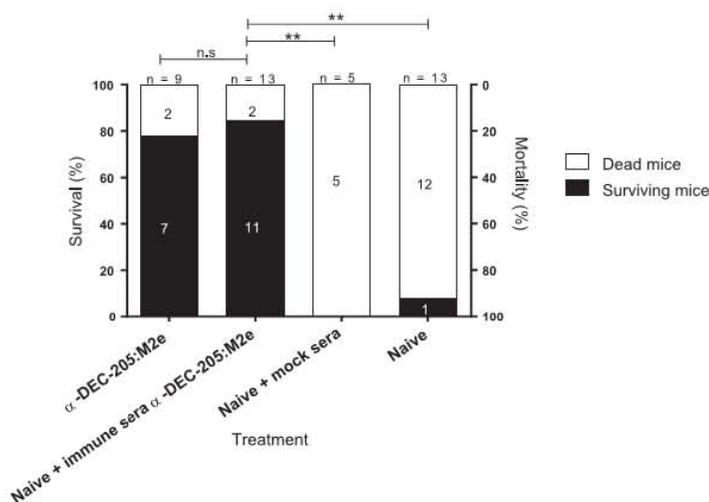


Fig. 4. Adoptive transference of serum anti-M2e Abs induces protection against IAV infection. Overall survival against lethal challenge with 30LD₅₀ of A/H3N2/NT/60/68. Experimental groups included: naive mice that were transferred i.p. with 350 μ L/mouse of a pooled sera obtained from mice immunized with α -DEC-205:M2e (post third immunization) (the titers of anti-M2e Abs were: IgG: 1:52,000, IgG1: 1:15,000 and IgG2a: 1:3,750); as negative controls: naive mice receiving mock sera (immunized with PBS plus poly I:C) and naive mice without transference of sera; as a positive control of protection, mice immunized with α -DEC-205:M2e were used. The figure represents the overall survival of 1 to 3 independent experiments represented as cumulative absolute numbers of surviving and non-surviving mice, graphed in stacked bars normalized to 100%. Statistically significant differences are symbolized as p values (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001).

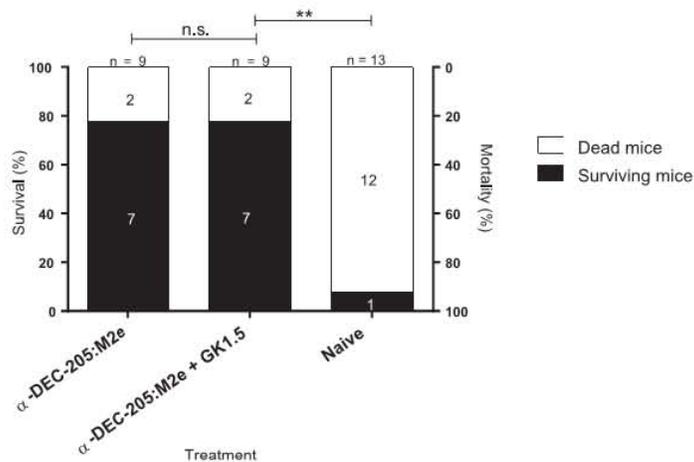


Fig. 5. Effector CD4⁺ T cells are not necessary for protection when M2e is targeted to DEC-205. Overall survival against lethal challenge with 30LD₅₀ of A/H3N2/NT/60/68. Experimental groups included: mice immunized with α -DEC-205:M2e; mice immunized with α -DEC-205:M2e and injected i.p. with three doses of 2.5 mg of purified anti-CD4 (GK1.5) mAb on days -3, 0 and +3 with respect to challenging day, and the naive group without treatment. The figure represents the overall survival of 2 to 3 independent experiments represented as cumulative absolute numbers of surviving and non-surviving mice, graphed in stacked bars normalized to 100%. Statistically significant differences are symbolized as p values (*, < 0.05; **, < 0.01; ***, < 0.001; ****, < 0.0001).

the IAV infection observed in mice inoculated with the α -DEC-205:M2e conjugate was not abrogated by the *in vivo* depletion of CD4⁺ T cells previous to the IAV challenge. This suggests a major role of CD4⁺ T cells as helper cells for antibody production.

In our model, high titers of serum anti-M2e Abs were present after the second immunization with the α -DEC-205:M2e conjugate, whereas only low titers of serum Abs were detected after the third inoculation in the group of mice immunized with

the isotype:M2e conjugate. Previous studies have shown that the M2e peptide contains both B and T cell epitopes within its short sequence [51]. More specifically, M2e contains a CD4⁺ T cell epitope [11,13] restricted to the MHC class II molecule IA^d, which is present in the BALB/c (H-2^d) mice used in this work. Thus, it is likely that the enhanced Ab response in mice immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate was the result of a very efficient induction of anti-M2e CD4⁺ T cells by DC via DEC-205 [25], which subsequently cooperated with M2e-specific B cells. Thus, the α -DEC-205:M2e conjugate would not only play a role targeting M2e to DC but would also act as a carrier complex so specific B cell receptors are able to recognize M2e. After processing, these cells would present the M2e-derived peptides to memory CD4⁺ T cells in the context of the MHC class II molecules.

In contrast, although the isotype:M2e conjugate could also act as a carrier complex to stimulated B cells, the low Abs titers observed could be explained by a poor induction of memory CD4⁺ T cells. Accordingly, Amorin et al. showed the importance of having B and T cells epitopes within a peptide sequence targeted to DEC-205 in order to induce strong specific antibody response [41], since when they targeted the polypeptide MSP₄₂ from *Plasmodium vivax* to DEC-205, which contains both B and T cell epitopes, a strong antibody response was induced. On the other hand, a fragment of this polypeptide containing only B cell epitopes (MSP₁₉) failed to do so.

The role of DEC-205 on activated B cells during the induction of high titers of serum Abs in mice immunized with the α -DEC-205:M2e conjugate should not be discarded. Although B cells poorly express DEC-205 compared to DC, its expression is enhanced when they become activated, as is their potential to capture and present peptides to T cells [52]. Moreover, germinal center B cells targeted with antigen via DEC-205 increase their potential to interact with Th and, therefore, to enhance the generation of plasma cells [23,24]. Thus, it is likely that the α -DEC-205:M2e conjugate not only stimulated B cells through antigen-specific receptors but also targeted M2e to DEC-205, present on the activated B cells, which resulted in an increased antigen presentation to memory CD4⁺ T cells and the generation of plasma cells.

Finally, targeting M2e to DEC-205 seems to be an efficient way to enhance the protective immune response against heterosubtypic infections by IAV, which provides a new alternative for the development of heterosubtypic "universal vaccines." Future experiments are needed to identify the precise immunological mechanisms involved.

Acknowledgments

We thank Gerardo Arreguin and Nancy Arias (Facultad de Medicina, UAEM), and Elizabeth Mata and Graciela Cabeza (Instituto de Biotecnología, UNAM) for the excellent animal house conditions. Carlos Arias for his neutral and critical point of view of the work. Erika Melchy and Carlos Mojica for their technical assistance in the flow cytometry assays. Juan Carlos Villegas-García for technical assistance. This work was supported by grants from SEP-CONACYT (2015-01-257420) and SEP-PRODEP (Redes temáticas de colaboración de CA, 2015). B.G.O. is a Postdoctoral fellow of the Graduate Science Program, INSP, and was supported by CONACYT. P.Q.H.O. is a Ph.D. student of the Biochemical Sciences Program, Instituto de Biotecnología, UNAM, and was supported by a CONACYT Scholarship (375463).

Contribution

E.G.F., P.Q.H.O. and L.G.D.V. conceived the study. P.Q.H.O. carried out the immunization and IAV challenge experiments,

participated in the rest of the experimental techniques employed, and drafted the manuscript. B.G.O. and G.X.L. participated in the characterization of mAb-Ag conjugates. LAJ.D. and A.B.Y. assisted in the derivation of BM-DC and other *in vitro* assays. M.H.J.L. participated in the culture and purification of IAV and other techniques. L.G.D.V. trained the first author in most of the techniques employed and advised the experimental work. E.G.F. directed the project and supervised the manuscript preparation. All authors participated in data interpretation and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.050>.

References

- [1] Iuliano AD et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet* 2018;391(10127):1285–300.
- [2] Neiryck S et al. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999;5(10):1157–63.
- [3] Fiers W et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 2009;27(45):6280–3.
- [4] Cho KJ et al. Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody. *J Virol* 2015;89(7):3700–11.
- [5] Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 1992;69(3):517–28.
- [6] Henkel JR et al. Influenza M2 proton channel activity selectively inhibits trans-Golgi network release of apical membrane and secreted proteins in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 2000;148(3):495–504.
- [7] Lee YN et al. Fc receptor is not required for inducing antibodies but plays a critical role in conferring protection after influenza M2 vaccination. *Immunology* 2014;143(2):300–9.
- [8] El Bakkouri K et al. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J Immunol* 2011;186(2):1022–31.
- [9] Simhadri VR et al. A human anti-M2 antibody mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and cytokine secretion by resting and cytokine-primed natural killer (NK) cells. *PLoS One* 2015;10(4):e0124677.
- [10] Lee YN et al. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *PLoS One* 2018;13(1):e0190868.
- [11] Eliasson DG et al. M2e-tetramer-specific memory CD4⁺ T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal Immunol* 2018;11(1):273–89.
- [12] Mozdanzowska K et al. Induction of influenza type A virus-specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine* 2003;21(19–20):2616–26.
- [13] Eliasson DG et al. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine* 2008;26(9):1243–52.
- [14] Feng J et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol J* 2006;3:102.
- [15] Gao X et al. Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge. *Antiviral Res* 2013;98(1):4–11.
- [16] Tompkins SM et al. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis* 2007;13(3):426–35.
- [17] Macri C et al. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin Transl Immunol*. 2016;5(3):e66.
- [18] Inaba K et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol* 1995;163(1):148–56.
- [19] Witmer-Pack MD et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* 1995;163(1):157–62.
- [20] Shrimpton RE et al. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol* 2009;46(6):1229–39.
- [21] Bonifaz L et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major

- histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002;196(12):1627–38.
- [22] Badillo-Godinez O et al. Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine* 2015;33(35):4228–37.
- [23] Victora GD et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010;143(4):592–605.
- [24] Pasqual G, Angelini A, Victora GD. Triggering positive selection of germinal center B cells by antigen targeting to DEC-205. *Methods Mol Biol* 2015;1291:125–34.
- [25] Bonifaz LC et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 2004;199(6):815–24.
- [26] Brown EG. Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8. *J Virol* 1990;64(9):4523–33.
- [27] Narasaraju T et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect* 2009;11(1):2–11.
- [28] Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol* 2016;5(2):85–6.
- [29] Treanor JJ et al. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol* 1990;64(3):1375–7.
- [30] Kim YJ et al. Roles of antibodies to influenza A virus hemagglutinin, neuraminidase, and M2e in conferring cross protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;493(1):393–8.
- [31] Schepens B, De Vlieger D, Saelens X. Vaccine options for influenza: thinking small. *Curr Opin Immunol* 2018;53:22–9.
- [32] Bozzacco I et al. HIV gag protein is efficiently cross-presented when targeted with an antibody towards the DEC-205 receptor in FR3 ligand-mobilized murine DC. *Eur J Immunol* 2010;40(1):36–46.
- [33] Do Y et al. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor. *Vaccine* 2012;30(45):6359–67.
- [34] Gurer C et al. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood* 2008;112(4):1231–9.
- [35] Leung CS et al. Robust T-cell stimulation by Epstein-Barr virus-transformed B cells after antigen targeting to DEC-205. *Blood* 2013;121(9):1584–94.
- [36] Maasko A et al. Mucosal expression of DEC-205 targeted allergen alleviates an asthmatic phenotype in mice. *J Control Release* 2016;237:14–22.
- [37] Petzold C et al. Targeted antigen delivery to DEC-205(+) dendritic cells for tolerogenic vaccination. *Rev Diabet Stud* 2012;9(4):305–18.
- [38] Wadwa M et al. Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces immune protection in experimental colitis in mice. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2016;6(1):1–8.
- [39] Coconi-Linares N et al. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 2013;31(19):2366–71.
- [40] Jauregui-Zuniga D et al. Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: Hemagglutinin of avian influenza virus example. *Res Vet Sci* 2017;111:55–62.
- [41] Amorim KN et al. The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205(+) dendritic cells. *Sci Rep* 2016;6:39250.
- [42] Boscardin SB et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* 2006;203(3):599–606.
- [43] Van den Hoecke S et al. Hierarchical and Redundant Roles of Activating FcγmR1s in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies. *J Virol* 2017;91(7).
- [44] Jegerlehner A et al. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* 2004;172(9):5598–605.
- [45] Tao W et al. Consensus M2e peptide conjugated to gold nanoparticles confers protection against H1N1, H3N2 and H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* 2017;141:62–72.
- [46] Guo Y et al. Highly conserved M2e and hemagglutinin epitope-based recombinant proteins induce protection against influenza virus infection. *Microbes Infect* 2017;19(12):641–7.
- [47] Schotsaert M et al. Natural and long-lasting cellular immune responses against influenza in the M2e-immune host. *Mucosal Immunol* 2013;6(2):276–87.
- [48] Rappazzo CG et al. Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in BALB/c mice. *Vaccine* 2016;34(10):1252–8.
- [49] Wu F et al. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* 2007;25(52):8868–73.
- [50] Herve PL et al. A novel subnucleocapsid nanopatform for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *J Virol* 2014;88(1):325–38.
- [51] Deng L et al. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2015;3(1):105–36.
- [52] Kamphorst AO et al. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J Immunol* 2010;185(6):3426–35.

Anexo B. Artículo de revisión publicado



Protective Antibodies Against Influenza Proteins

Herbey O. Padilla-Quirarte^{1,2*}, Delia V. Lopez-Guerrero³, Lourdes Gutierrez-Xicotencatl⁴ and Fernando Esquivel-Guadarrama^{1*}

¹ UN, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico, ² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ³ Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Luis F. Garcia,
University of Antioquia, Colombia

Reviewed by:

Florian Krammer,
Icahn School of Medicine at Mount
Sinai, United States
Elsa Vicenzi,
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy

*Correspondence:

Herbey O. Padilla-Quirarte
herbey_oswaldo@hotmail.com
Fernando Esquivel-Guadarrama
fernando.esquivel@uaem.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 March 2019

Accepted: 04 July 2019

Published: 18 July 2019

Citation:

Padilla-Quirarte HO,
Lopez-Guerrero DV,
Gutierrez-Xicotencatl L and
Esquivel-Guadarrama F (2019)
Protective Antibodies Against
Influenza Proteins.
Front. Immunol. 10:1677.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01677

The influenza A virus infection continues to be a threat to the human population. The seasonal variation of the virus and the likelihood of periodical pandemics caused by completely new virus strains make it difficult to produce vaccines that efficiently protect against this infection. Antibodies (Abs) are very important in preventing the infection and in blocking virus propagation once the infection has taken place. However, the precise protection mechanism provided by these Abs still needs to be established. Furthermore, most research has focused on Abs directed to the globular head domain of hemagglutinin (HA). However, other domains of HA (like the stem) and other proteins are also able to elicit protective Ab responses. In this article, we review the current knowledge about the role of both neutralizing and non-neutralizing anti-influenza proteins Abs that play a protective role during infection or vaccination.

Keywords: influenza A virus, neutralizing antibodies, non-neutralizing antibodies, influenza proteins, protective antibodies

INTRODUCTION

The influenza proteins are recognized as foreign by the immune system, and antibodies (Abs) against them are produced during vaccination or after a natural infection. The Ab response can be *neutralizing* or *non-neutralizing*. *Neutralization* refers to the reduction of viral infectivity exerted by an Ab when binding to a virus. *Neutralizing Abs* inhibit virion cell entry because their epitopes are located near the receptor-binding site (RBS) on the globular head of HA. They can also interfere with the conformational changes necessary to expose the fusion peptide on HA (anti-stalk Abs). Despite the fact that neutralizing Abs are protective, the term neutralization has been often misused as a synonym of protection. Actually, these terms point to very different processes: whereas neutralizing Abs are defined by *in vitro* assays (e.g., hemagglutination inhibition and microneutralization assays), the term protection is associated to the reduction of morbidity and mortality *in vivo*. In this context, a minor fraction of *non-neutralizing Abs* that are generated upon the recognition of other viral epitopes can also be protective by other mechanisms, such as those that do not involve interfering the virus-cellular receptor interaction like increasing phagocytosis, activating complement or promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (1).

Influenza Virus

The Influenza A Virus (IAV) is a negative-sense single-stranded RNA virus of the *Orthomyxoviridae* family. The virion contains eight gene segments, encoding for at least 11 viral proteins. These gene segments are associated to the nucleoprotein (NP) and the polymerases (PB1, PB2, and PA), which

form the ribonucleoprotein (vRNP) complex. The vRNP complex is surrounded by matrix protein 1 (M1), which forms the core of the virion. This structure is covered by a lipidic membrane acquired from the host cell. This membrane contains the glycoproteins HA and neuraminidase (NA), which jointly represent over ninety percent of the protein present in the membrane. Furthermore, matrix protein 2 (M2) forms a homotrimeric structure that crosses the viral lipidic membrane and functions as a pH-dependent ion channel (2). Each virion only contains approximately 20-60 M2-channels. Finally, few molecules of the nuclear export protein (NEP, formerly named NS2) are associated with M1 within the virion (3).

The IAV infects human epithelial cells in the respiratory tract by binding HA to the sialic acid residues present on their surface; this is followed by virus internalization through receptor-mediated endocytosis. Upon endosome acidification, HA undergoes conformational changes that allow it to expose the fusion peptide that promotes viral-endosomal membrane fusion. On the other hand, the IAV core is also acidified by the entry of protons through the M2-ion channel. Both processes allow the vRNPs to be released into the cytoplasm, from where they are transported to the nucleus via nuclear localization signals (NLS) present in all vRNPs. Once in the nucleus, positive sense RNA is transcribed into mRNAs and replicated to produce a full-length complementary replicative intermediate (cRNA) by the viral RNA-dependent RNA polymerase. Afterwards, the mRNAs exit the nucleus to be translated by ribosomes, and the cRNA will serve as template to produce viral RNA (vRNA). Newly synthesized viral proteins come back to nucleus to assemble vRNPs, which, assisted by the NEP protein, will be exported to the cytoplasm where they are now ready for the packaging process in the cell membrane. The budding process of the newly assembled virions is largely facilitated by the M1 protein that recruits the necessary viral and host cell components. Finally, the NA promotes the viral exit process by pruning the interactions between sialic acid and the newly formed virions (2, 4).

Other non-structural (NS) proteins are produced during the IAV infection cycle. They play major roles in modulating the immune system to facilitate the infection. NS1 inhibits type I interferons by binding directly to RIG-I (retinoic-acid-inducible gene-1) and/or impeding its ubiquitination by interacting with the E3 ligase TRIM25 (tripartite motif-containing protein 25) (5, 6). PB1-F2 protein has been shown to have proapoptotic activity in epithelial and immune cells, such as macrophages (7). Finally, the PA-X protein degrades the host transcripts in the nucleus (6).

There are two major mechanisms of IAV evolution: *antigenic drift* and *antigenic shift*. The antigenic drift occurs frequently because of the poor fidelity of RNA polymerase that generates point mutations in the HA and the NA, that allow the virus to escape from neutralizing Abs. Eventually, these mutations are introduced into the circulating viral strains. This mechanism makes it necessary the annual revision of seasonal influenza vaccines. On the contrary, the antigenic shift occurs rarely, and consists in the generation of a completely new antigenic strain by the reassortment of gene segments during co-infections with human, avian and swine viruses.

These evolutionary strategies are responsible for epidemics (antigenic drift) and pandemics (antigenic shift). The challenge posed by IAV is the generation of a "universal vaccine," which could offer protection against any epidemic or pandemic strain (8).

Influenza Virus Vaccines

Currently, there are three types of licensed human influenza vaccines: trivalent/quadrivalent inactivated vaccines (TIV/QIV) live attenuated vaccines (LAIV) and the recombinant vaccine Flublok. TIV/QIV are administered intramuscularly. They are non-adjuvanted inactivated vaccines composed of three or four circulating influenza virus strains (H1N1, H5N2, B; or two B strains for QIV). The strains are grown individually in embryonated chicken eggs and manipulated to harbor all internal genes from the A/PRN/34 (H1N1) virus and two HA and NA genes corresponding to the circulating strains each year. There are three types of inactivated vaccines: whole virus vaccines, split virus vaccines, and subunit vaccines. In whole-virus vaccines, the allantoic fluid is harvested after the culture, and the virus is chemically inactivated with formalin or β -propiolactone. Split-vaccines add an extra step with detergent to make it less reactogenic by removing RNA. In subunit-vaccines, the HA of each virus is further purified. On the other hand, LAIV consist of cold-adapted virus, and they are administered intranasally. They do not replicate well in the lower respiratory tract, but they do in the nasal cavities. Flublok is a trivalent recombinant hemagglutinin influenza vaccine, licensed by the FDA (US Food and Drug Administration) in 2013, that contains HA antigens derived from the three influenza virus strains recommended by the World Health Organization (WHO) annually (9).

For seasonal vaccines, the main mechanism of protection is the induction of neutralizing Abs specific for the globular domain of HA. This parameter can be measured by hemagglutination inhibition or neutralization assays, where a serum titer ≥ 40 is correlated to protection. Unfortunately, the effectiveness of these vaccines depends on the accuracy of the virus strain selection process coordinated by the WHO. An inaccurate selection of strains may explain why the vaccines have shown low levels of protection in certain years (10).

B-Cell Response Against the Influenza Virus: Learnings From the Mouse Model

The first Abs that participate in clearing an influenza infection are the so-called *natural Abs*, which are polyreactive Abs, mainly IgM, secreted by CD5⁺ B-1 cells present in pleural and peritoneal cavities. These Abs are continuously produced in the absence of infection, and they have low affinity for the antigens (11). The role of natural Abs in the influenza infection was addressed by Baumgarth et al., who showed that the passive transfer of naive serum from wild-type to IgM KO ($^{-/-}$) mice infected with influenza reduced the mortality in comparison to the controls (12). These Abs are present in airways in high levels, since they are transported to mucosal surfaces by poly-Ig-receptors located in the basolateral membrane of the alveolar epithelial cells (13). They could

neutralize the IAV directly, or lyse cells by fixing complement (14). However, the levels of natural Abs are usually low, and most pathogens can overcome this barrier and establish an infection.

For an influenza-specific B-cell response to occur, the antigen must travel to secondary lymph organs (SLO) like draining lymph nodes and/or mucosa-associated lymphoid tissues (MALT). There, specific B cells encounter the antigen for the first time; then, they are differentiated to antibody-secreting cells (ASC) (15). Once in the LN or the spleen, the antigen may be captured, by two main types of cells; subcapsular sinus macrophages (SSM) and medullary dendritic cells (MDC), which capture the antigen mostly opsonized by complement components and thus, facilitate its encounter with the B cells. Then, the virus is transported and handed to the follicular dendritic cells (FDC), which retain it for continuous antigen presentation during long periods of time. These cells serve as major promoters of center germinal formation (15, 16).

Once the influenza antigens reach the draining lymph nodes, two types of B cell responses take place: the extrafollicular (EF) and the germinal center (GC) responses. Within the first days of infection (48–72 hpi), Abs are secreted by extrafollicular plasmablasts (short-lived antibody secreting cells). These early specific Abs play an important role in dealing with primary infections, because they contribute to ameliorate the disease outcome. This is mainly a T-dependent response, although some minor T-independent responses have been documented (17).

On the other hand, some virus-specific B cells migrate toward the marginal zone of the B follicles, where they interact with CD4⁺ T cells triggering a germinal center reaction (GCR) that leads, late during the infection, to the generation of long-lived plasma cells that maintain high levels of high-affinity Abs, which is the most desirable consequence of vaccination or infection, along with long-lived memory B cells (18). Briefly, in the GCR, follicular helper T cells (T_{fh}), which express CD40L and cytokines like IL-4, IFN- γ , and TGF- β , induce immunoglobulin class switching of activated B cells. Moreover, T_{fh} and B cells physically interact via ICOS/ICOSL, PD-1/PD-L1, CD28/B7 and other co-stimulating signals, leading to IL-21 secretion. Jointly, these signals promote somatic hypermutation and affinity maturation, resulting in influenza-specific high-affinity-ASCs. At the same time, during the GCR, some ASCs differentiate into memory B cells, which can be defined as cells that have undergone antigen-driven proliferation and have then become non-proliferating cells. They can be induced by re-exposure to the antigen and afterwards proliferate and secrete Abs. (15).

During subsequent IAV infections, GC response from GC-derived memory B cells dominate the response, however, the role of the EF B cells cannot be discarded since it has been shown in an antigen-specific experimental mouse model that the GC-derived memory B cells pool can respond as EF in a secondary response (19). In humans, high throughput sequencing of the B cell repertoire after infection or vaccination could help to understand the dynamic of EF and GC responses.

ANTIBODIES AGAINST IAV EXTERNAL PROTEINS

HA-Specific Antibodies

HA from influenza viruses is a spike-shaped protein that extends from the surface of the virus. The HA precursor (HA0) trimerizes in the ER and in the virion surface is processed by tissue trypsin generating two polypeptides: HA1 and HA2, which interact through disulfide bonds. HA1 comprises the globular region of the molecule (head), which contains the RBS, and the upper part of the stem region. HA2 covers the major part of the stem region, and it contains the fusion peptide. Currently, 18 different serological IAV HA subtypes have been described, and they have been divided into two phylogenetic groups: group 1 (including H1, H2, H5) and group 2 (including H3 and H7). In humans, H1 and H3 are the most frequent HAs present in circulating strains, and they are the main components of inactivated seasonal vaccines. However, some HAs from avian viruses such as H5 and H7 (e.g., H5N1 and H7N9) have crossed the interspecies barrier infecting humans and causing occasional outbreaks (20, 21).

Antibodies Against the Globular Domain of HA

Classical neutralizing antibodies: original antigenic sin

Most of the classical neutralizing Abs against influenza are directed to the conformational epitopes on HA, particularly the globular domain, which has been well-characterized as the immunodominant region of this protein. Since the early eighties, using monoclonal Abs (mAbs) as a tool, five non-overlapping sites (Sb, Sa, Ca1, Ca2 and Cb, or A-E sites) were identified as the major regions recognized by neutralizing Abs (22–25). Sites Sa and Sb are located at the top of the globular domain of HA, while Ca1, Ca2, and Cb are located at the bottom of the head (22).

Using a mouse model, it was shown by Angeletti et al., that there is a hierarchy among the five antigenic sites of the HA molecule of PR8 virus (H1N1), that depends on the immune response progress, the genetic background and the way in which the antigen is formulated and delivered: Cb-specific B-cells are predominant in the immediate response after infection, but they are substituted by Sb-specific B-cells at day 21. This hierarchy was not influenced by CD4⁺ T cells, and it may change with different administration routes and different strains of mice (26). Later, Liu et al., analyzed the hierarchy of immunodominance for the HA of a post-2009 influenza pandemic strain, A/Michigan/45/2015 (H1N1) in several species including humans: while no specific immunodominance pattern was found with guinea pigs, Sb and Ca-specific Abs dominated the immune response in mice and the site Sa was dominant in ferrets. For humans it was reported a completely different pattern in which Sa and Sb-specific Abs dominated the antibody response (27). Similarly, for H3 virus, Broecker et al. found that the B site (analog to sites Sa and Sb in H1 HA) in the HA protein of the H3N2 strain that circulated in the 2017–2108 season was immunodominant pre and post-vaccination in humans that received seasonal vaccine. The same pattern of immunodominance was found with mice, but unlike reported by Angeletti et al., it was independent of genetic background and immunization route (28, 29).

Abs elicited against the HA globular domain during infection or vaccination usually are strain-specific, and they will hardly neutralize subsequent influenza virus strains (homosubtypic protection). This is explained by the selective pressure exerted by the immune system, which leads to the rise of new strains (with minor amino acid substitutions in the five neutralizing sites of HA head) that can avoid previous Abs (escape mutants). This evolutionary mechanism (antigenic drift) makes it necessary the annual reformulation of seasonal influenza vaccines.

Only specific Abs for the head of HA efficiently prevent infection, by blocking the HA-mediated attachment to the cell surface (26). Anti-HA Abs can also have an effect on the activity of other influenza-related proteins. Several authors have found both in humans and mice that anti-HA Abs can also interfere with the activity of neuraminidase (NA) by blocking virus binding to the surface bound NA-substrate or by sterically inhibiting NA access to the substrates (30–32).

An important feature of the neutralizing anti-IAV Ab response, predominantly involving the globular domain of HA, is the phenomenon called *original antigenic sin* (OAS). The term was coined in 1960 by Thomas Francis to describe the fact that in humans, influenza virus infections in childhood leaves an immunological imprint that results in high Abs titers against the childhood encountered virus after being boosted by new drifted virus (33, 34). These Abs are mainly directed against the conserved epitopes present in the different virus strains. A possible explanation for this phenomenon, is that there is a competition between memory B cells specific for the first strains and naïve cells specific for the new strain, which need to meet more requirements for activation, such as higher antigen doses (35). Another interesting hypothesis to explain the OAS, is that the T regulatory cells induced by the first antigen reduce the amount of the second antigen available to activate naïve B cells (36).

An example of OAS was observed in the most recent pandemic caused by an IAV H1N1 in 2009 (pH1N1/2009). As previously stated, the HA head does not induce a high level of cross-reactivity. However, the frequency of severe disease among elderly people infected with the pandemic strain was lower than it was among younger individuals, suggesting preexisting immunity. In this regard, IAV HA is more closely related to the 1918 pandemic virus A/South Carolina/1/1918 (H1N1) than HAs from seasonal strains, and those individuals who more likely experienced pre-1957 H1N1 strains had higher titers of neutralizing Abs to the 2009 H1N1 strain (37, 38). An interesting fact was that the main antigenic determinants of these Abs were located on the Sa site of the globular domain of HA, shared between the 1918 and 2009 strains (39).

Despite the fact that the term OAS was proposed almost 60 years ago, it is still valid, and elucidating the role of this phenomenon in infection and vaccination processes continues to be relevant. In a recent study Lindermann and Hensley found by using serum passive-transfer experiments in a mouse model, that Abs with an OAS phenotype were effective in neutralizing antigenically different influenza virus strains *in vivo*, indicating that OAS-Abs are an important mechanism of protection in secondary immune responses (40). However, according to two

other studies, this phenomenon seems to have no impact on the response to vaccination in humans (41, 42). Further studies are necessary to determine more precisely the role of OAS after infection or vaccination against IAV.

Anti-HA head broadly neutralizing antibodies

Despite the fact that most anti-HA head Abs are strain-specific, in 2009 the mAb 5E139F7 was isolated from a mouse immunized with an H3 virus. Surprisingly, this Ab neutralized multiple subtypes, including H1, H2 and H3 strains, and its epitope is located in the antigen site B near the RBS (43).

In the same way, the human mAb CH65 was isolated from an adult resident of the United States that had received the 2007 TIV. According to crystallographic studies with the A/H1N1/Solomon Islands/3/2006 strain, CH65 Ab mimics the physiologic interaction between sialic acid and HA, as this antibody binds directly to the sialic-acid pocket through its HCDR3. In this report, CH65 neutralized 30 out of 36 influenza H1N1 strains *in vitro* (44). Other receptor-binding site mAb (C05) was isolated by Ekiert et al. using phage antibody libraries from a human donor. The mAb C05 binds directly to RBS on HA using mainly its HCDR3 and with minor interaction through its HCDR1, and is capable to neutralize group 1 and group 2 influenza virus strains (45).

Furthermore, anti-head broadly neutralizing mAbs whose epitopes are farther from the RBS have been described. Ohshima et al. isolated mAbs F045-092 and F026-427 from human B lymphocytes. These mAbs showed activity against the H1N1, H3N2 and H5N1 viruses, and their epitopes were also found to be on the globular head of HA (46). D1-8 is a human mAb whose epitope is close to the D antigenic site, different from the RBS, and it is highly conserved among the H3N2 viruses. In mice, it has a better therapeutic effect than oseltamivir (47).

Antibodies Against the HA Stem

Anti-HA stem broadly neutralizing antibodies

In contrast to the globular domain of HA, the stem domain (or stalk domain) of HA is far less variable, and it has been shown to induce broadly neutralizing Abs (bnAbs). In 1993, Okuno et al. described for the first time a mAb (C179) specific for the HA stem region in mice. It had no hemagglutination inhibition activity (HIAI), but it was capable of neutralizing H1 and H2 viruses (group 1) (48). Recently, a number of mAbs, which have displayed protective activity in mice and have a broad range of neutralization activity for group 1 (CR6261), group 2 (CR8020), and both groups of influenza viruses (F16) (49–51), have been described in humans. Unfortunately, their epitopes are subdominant after infection or vaccination and, therefore, new strategies have been proposed to boost the generation of Abs against the stem domain.

Most human anti-stem Abs, particularly those against HAs from group 1 (e.g., CR6261 and F10), use the V_{H1-69} gene family. These broadly reactive Abs are characterized by a phenylalanine in position 54 at the HCDR2 region unique to the V_{H1-69} gene. This provides them with a unique ability to form hydrophobic interactions with the hydrophobic groove between HA1 and HA2, using only their heavy chains. Thus, they inhibit the

conformational changes necessary for the fusion of viral-cell membranes (52–54).

Regarding group 2 Abs, prototype human mAb CR8020 binds a different epitope from that of CR6261/F10. Although the epitope is also on the HA stem, it is closer to the virus membrane. This antibody uses both heavy and light chains to make contact with its epitope, and the fusion peptide accounts for 50% of the Van der Waals forces involved in the Fab-HA binding (50).

The human mAb F16 recognizes both groups of HAs, since it is able to bind to their fusion peptide. This mAb was isolated from human plasmablasts. Its heavy and light chains correspond to the $V_{H1.3-30^*18}$ and V_{L4-1^*01} gene families, respectively. Although this mAb's binding site overlaps with that of mAb CR6261/F10, F16 makes contact only with the HCDR3 region, while CR6261/F10 encompasses all three HCDR regions (49). Recently, S9-1-10/5-1 was described as a human mAb that uses the gene $V_{H1.4-59}$ family and displays specificity to both HA groups. Although it binds to the HA2 A-helix, apparently it does not inhibit the virus entry. Instead, it binds to HA on the surface of the infected cells, thus preventing the viral particle release (55).

Although the occurrence of anti-stem Abs is low after a seasonal infection or vaccination, several reports indicate that these Abs are boosted after sequential infections or immunizations with viruses containing different types of globular HA, but essentially the same stem HA (56). Recently, Nachbagaer et al. analyzed the cross-reactivity pattern of anti-HA Abs after an influenza infection in patients diagnosed with pH1N1/2009 or seasonal H3N2, and they found that a pH1N1 infection induces a broader response (against group 1 and group 2 HAs) than an H3N2 infection does. This can be explained because the 2009 pandemic strain had a novel HA head, compared with that of seasonal viruses, and thus, could boost the response against the HA stem region (57).

With respect to the 2009 pandemic vaccination, Cortina Ceбалlos et al. analyzed the B cell repertoire in individuals, with no previous exposure to pH1N1/2009, after they received the monovalent inactivated vaccine containing the pandemic strain (09 MIV). They reported heterosubtypic neutralizing seroconversion in 17% of the individuals. The phenomenon was associated to a clonal expansion of B cells that used the $V_{H1.1-69}$ segment and to other cells involved in the generation of anti-stem Abs (58). In the same context, Li et al. analyzed B-cell responses from vaccine-induced plasmablasts in healthy adults after they had received 09 MIV. They observed high levels of cross-reactivity against the HA-stem domain. This cross-reactivity pattern occurred in the case of pandemic vaccination, and it was not seen with the seasonal TIV. Furthermore, they found that just like seasonal vaccines (TIV), anti-stem Abs had arisen from preexisting memory B cells even before the emergence of the 2009 pandemic virus, which suggests that they were induced by previous strains (59).

Additionally, the repertoire of B cells from individuals vaccinated in consecutive years with the pandemic strain pH1N1/2009 was analyzed by Andrews et al. They showed that the individuals with low basal levels of Abs specific for this strain generated a broadly reactive response directed mainly against the HA stem. On the other hand, individuals with high levels of Abs

before vaccination correlated with a dominant response against the HA head domain after immunization. The authors suggest that the repertoire of anti-stem B cell memory is preexistent and that the immunodominance of the HA globular domain prevails with the subsequent encounters with the influenza virus (60). This observation echoes the dilemma of producing a universal vaccine that promotes the generation of anti-stem Abs or rather using the Abs in passive immunization strategies in infected individuals, since it is possible that consecutive challenges with seasonal strains of influenza will move the balance in favor of anti-head Abs.

It is well-known that anti-stem Abs are less permissive to virus escape, but Choi et al. identified three escape mutants in virus strain A/Perth/16/2009 (H3N2) after it was co-cultured *in vitro* with the human mAb 39.29, which neutralizes all IAV subtypes. The authors described that mutant Gly387Lys totally eradicates the antibody binding, while mutants Asp391Tyr and Asp391Gly increase the ability of HA to fuse membranes with just a slight interference in binding at low pH (61).

NA-Specific Antibodies

Neuraminidase is the second most abundant glycoprotein on the surface of the influenza virion. It is a homotrimer with a mushroom-like form, and it plays two major roles during the IAV infection: It promotes adhesion to the receptors on the epithelial cells because it degrades mucus, and it facilitates viral exit by breaking the interactions between sialic acid and the newborn virions. Neuraminidase inhibitors like oseltamivir act by inhibiting the last step and causing virus aggregation on the cell surface. Each NA monomer is composed of approximately 470 amino acids that form four domains: a short cytoplasmic N-terminal domain that is 100% homologous among influenza strains, a transmembrane hydrophobic domain, and a stem-shaped C-terminal domain of variable longitude, which ends in a globular domain where the enzymatic site is located (62).

Anti-NA Abs have historically been underestimated, due to the central role that HA has played in influenza research. However, for the last 50 years, important data have been gathered suggesting that anti-NA Abs can offer protection against the influenza infection. In 1968, Schulman et al. demonstrated that Abs against this protein are produced in mice after an IAV infection. The outcome of an infection in naive mice improved when NA-immune serum was transferred to them (63). The same research group confirmed that anti-NA Abs were also present in humans after an influenza infection (64). Later, Murphy et al. investigated the role of anti-NA Abs in a clinical study carried out with volunteers, with low basal levels of anti-HA Abs and variable levels of anti-NA Abs. These subjects were infected with influenza virus A/NY/60/68 (H3N2), and the authors observed that the individuals who displayed minimal symptoms had higher levels of anti-NA Abs (65).

Recently, Chen et al. found in humans that seasonal vaccination induces a poor NA-specific B-cell response, whereas anti-NA B-cell responses after an IAV infection are similar (H1N1) or even higher (H3N2) when compared to HA-specific B-cell responses. The authors also found that anti-NA Abs were cross-reactive to NA proteins from most IAV strains and

that they showed prophylactic and therapeutic potential when evaluated *in vivo* (66).

NA-specific Abs induce infection-permissive immunity by limiting the viral load through interference with the exit of the virions. In other words, they do not prevent infection, but they contribute to ameliorate the clinical symptoms of disease. Among these Abs, those that are directed to the enzymatic site have the highest activity of neuraminidase inhibition (NAI), because they apparently limit the access of natural substrate to the catalytic site (67). Furthermore, anti-NA Abs are able to exert immune pressure within the globular domain of NA by promoting escape mutants (antigenic drift), which is an indirect proof that they play a role in immunity against LAV (68).

In the case of anti-NA Abs, there is also evidence of original antigenic sin. As stated previously, during the last IAV pandemic (pH1N1/2009), there was a low incidence of illness among elderly people. This was attributed to their previous exposure to similar IAV strains during childhood, which induced a recall response to the conserved domains of HA present in the strains. Similarly, Marcelin et al. found that NAI Abs were present in the sera from older people, and seroconversion was only registered in the age group ≥ 70 years after TIV vaccination. This provides evidence that NA-specific B cells from past strains were activated by the pH1N1/2009 virus, and they contributed to the protection process (69). In the same way, Rajendran et al., found that anti-NA Abs levels are directly proportional to age, and their reactivity are highest against influenza virus strains that more likely circulated during their childhood [A/South Carolina/1/1918 (H1N1), and A/Singapore/1/1957 (H2N2) in elderly; A/USSR/92/1977 (H1N1) and A/Philippines/2/1982 (H3N2) in adults] (31).

A unique opportunity to elucidate the independent contribution of the anti-NA Abs to the protection process was the 1968 Hong Kong IAV pandemic, during which a new virus (H3N2) emerged. It had a new HA, while the NA remained the same as in the circulating seasonal strain. Thus, evidence pointed out that anti-NA Abs played a key role in reducing the severity of the disease (70).

It is well-known that the gold standard for evaluation of vaccine efficacy is the HAI titer, where a value ≥ 40 is taken as protective by the FDA in the United States (71). Nonetheless and despite the lack of data regarding the contribution of anti-NA Abs in protection, Memoly et al. studied in humans the role of the NAI titer levels in predicting protection against influenza. They found that the same value of NAI titers (≥ 40) correlated better with the prediction of protection, even at higher levels than the HAI titer, which is only associated to a reduction of virus shedding. High levels of NAI titers also correlated with the reduction of the viral load and the duration and severity of the infection, among other symptoms (72). Similarly, Couch et al., confirmed by multivariate analysis that anti-NA Abs titers in serum and nasal secretions are independent predictors of immunity and protection to influenza in samples taken pre and post pandemic of 2009 (73). These results suggest that in addition to HAI, also NAI titers can serve as predictors of protection.

Anti-NA Abs are also produced in response to the administration of seasonal vaccines. Recently, Monto et al. showed that 37 and 6% of human recipients of TIV and LAIV, respectively, had Abs with NAI activity, whereas the values of HAI for these same groups were 77 and 21.2%, respectively. They also reported that after the 2007–2008 influenza season, NAI levels in subjects with confirmed infection rose to 41% for TIV, 63% for LAIV, and 76 % for unvaccinated subjects, whereas HAI levels were 18%, 77% and 97%, respectively (74).

Regarding cross-protection of anti-NA Abs, mice vaccinated with different recombinant NA resulted in reduction of mortality against influenza virus challenges with heterologous (not heterosubtypic) strains. This protection was dependent of specific-NA Abs, as shown by passive transference experiments (75). Additionally, Sandbulte et al. found that anti-N1 Abs can protect mice from a lethal challenge with the avian H5N1 subtype when previously immunized with a DNA vaccine encoding for N1 from human virus A/New Caledonia/20/99 (H1N1). Furthermore, they showed that human Abs detected in 81.6% (31/38) of the subjects were capable of inhibiting NA activity against the avian strain, suggesting that the incorporation of NA to TIV vaccines or the natural infection could offer protection against new pandemic strains such as H5N1(76). In this respect, Gillim-Rose and Subbarao debated Sandbulte's hypothesis pointing out that these data are still insufficient to predict a protective heterologous response to H5N1 in the human population. In consequence, forthcoming studies should focus on the magnitude and biological advantage of cross-reactive N1 Abs before considering the inclusion of this IAV protein in a vaccine (77).

Up to now, discussion has focused on the possible incorporation of NA in an anti-influenza vaccine. However, more information is required to determine the amount of antigen, the serologic data of NAI titers, and the type of vaccine to achieve the best protective immune response in humans. In this regard, present vaccines are designed for the production of anti-HA Abs, while the NA content has not yet been standardized (78). Attenuated vaccines present the same concern as a natural infection, since they contain a considerable higher proportion of HA than of NA (5:1) in the virion, which leads to an antigenic competition, where the HA-specific B-cell response overcomes the NA-specific B cell response (68, 79, 80). However, this antigenic superiority of HA over NA in terms of antibody production observed both in the natural infection and with vaccination is lost when proteins are administered separately and in the same proportion (81). Altogether, NA is a promissory candidate for the design of better vaccines against IAV. However, it seems that current data on NA-immunity is still insufficient. In this regard, for a more specific review, a recent publication addressed thoroughly the major knowledge gaps, pointing out the actions that should be taken on this matter (82).

Fc Receptors (FcR)-Mediated Effector Functions for HA- and NA-Antibodies

In addition to previously described mechanisms of protection for HA-Abs, indirect antiviral FcR-mediated effector functions

like ADCC, antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) and complement mediated cell-cytotoxicity (CDC) have been described both in humans and mice (83–92). Also, ADCC has been described for NA-Abs (87). Although, these mechanisms of protection will not be addressed further in this article, these effector antiviral function of HA- and NA-Abs may have an important role on protection against IAV infection.

Antibodies Against M2 Protein

Matrix protein 2 (M2) is the third most abundant protein on the IAV virion surface. It is a type III integral protein arranged as a homotetrameric channel linked by disulfide bonds, which function as proton selectors. They induce the acidification of the virions and consequently the dissociation of the vRNPs from matrix protein (M1) and their release into the cytoplasm during the entry phase of the IAV cycle. The M2 protein is 96 amino acids long, and it has three domains: a cytoplasmic C-terminal (54 aa), a transmembrane (19 aa), and a short and highly conserved N-terminal ectodomain (M2e, 23 aa). Antiviral drugs amantadine and rimantadine target M2, blocking the proton influx into the virion through an allosteric effect (93).

The density of M2 in the virion is low (approximately 60 molecules/virion) compared to the high concentration of HA or NA on the viral membrane. These major glycoproteins also exert an allosteric blockade of M2, which makes it difficult to be reached by B-cell receptors and thus, it generates minimal immunogenicity during a natural infection. However, the N-terminal ectodomain of M2 (M2e) has been targeted in the design of a "universal vaccine," because it is highly conserved among influenza strains, and because the capacity of anti-M2e Abs to generate heterosubtypic protective responses has been observed in mice (94).

The immunogenicity of M2e was first reported in 1988 by Zebede and Lamb. They described a mAb (14C2) that was produced in mice immunized with M2 protein plus adjuvant. This mAb recognized the ectodomain of the protein, and it was able to detect M2 on the virions, thus reducing viral growth. This was evidenced by the size reduction of lytic plaques when 14C2 was added to previously IAV-infected MDCK cells (95). Later, Treanor et al. proved that this antibody reduced lung viral titers when ascitic fluid was passively transferred to naïve mice that were afterwards challenged with IAV (96).

Abs against M2 are not neutralizing. Nonetheless, due to the high expression of M2 on the surface of infected cells, they can contribute to the protection process by promoting effector functions based on their Fc region. Lee *et al.* reported that anti-M2e Abs were not protective in Fc receptor common γ -chain deficient mice (Fc γ 2 $^{-/-}$) in comparison to the high protection observed among wild-type mice in passive transfer experiments (97). In this context, El Baakouri et al. reported in a mouse model that protection induced by these Abs depended on phagocytosis of infected cells by alveolar macrophages (AM) by engagement to the Fc receptors (Fc γ RIII for IgG1, and Fc γ R1 and/or Fc γ RIV for IgG2a) present in these cells (98). Furthermore, NK cells can induce ADCC by binding to the Fc domain of anti-M2 Abs. Simhadri et al. showed that freshly isolated and cytokine-primed NK cells in presence of a

human anti-M2 antibody (1–10 mAb) can exert ADCC and secrete cytokines (99). The role of CDC in M2e immunity is controversial: Jegerlehner et al. reported that anti-M2e Abs do not eliminate infected cells by CDC (100), whereas Wang et al., reported that complement is necessary for an anti-M2e mAb to control lung viral titers in challenged mice (101).

Several reports in mice have shown that M2e can induce an efficient heterosubtypic protection. Different approaches have been used to determine this, such as coupling M2e to carrier proteins—like the hepatitis B virus core protein (HBc) (102)—or to flagellin (103); conjugated to nanoparticles of gold (104); inserted in VLPs (105); as DNA vaccines (106), and others. Recently, the efficacy of Abs against HA (induced by TIV), against NA (recombinant N1 and N2) and against M2 (M2e5XVLP) was compared in mice. It was found that immune sera against NA and M2e were superior in terms of improving heterosubtypic protection and survival than anti-HA. Abs induced by the split M2e5XVLP immune sera gave rise to a synergistic heterologous protection effect (107).

In general, the levels of M2-specific Abs in sera of IAV infected patients are low and non-durable (108, 109). However, one study has suggested that anti-M2 Abs may increase with age after a pandemic strain appears. It is explained that a recall humoral response to this protein could be boosted, since the presence of anti-M2 Abs after infection with the pH1N1/2009 strain was detected in nearly 50% of the samples tested, even before anti-HA Abs specific to this strain could be identified (109).

Moreover, anti-M2e Abs have shown to be protective in humans. In a controlled challenged study, the administration of a specific anti-M2e IgG mAb (TCN-032), showed a reduction of 35% of symptoms compared to group that received placebo, when challenged with influenza virus A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (110). Also, several phase I and II clinical trials of M2e-based vaccines have shown to be safe and immunogenic in humans (103, 111, 112), and recently a phase I clinical trial started to evaluate a hepatitis B core-M2e-based vaccine in Russia (NCT03789539) (113).

ANTIBODIES AGAINST INTERNAL PROTEINS

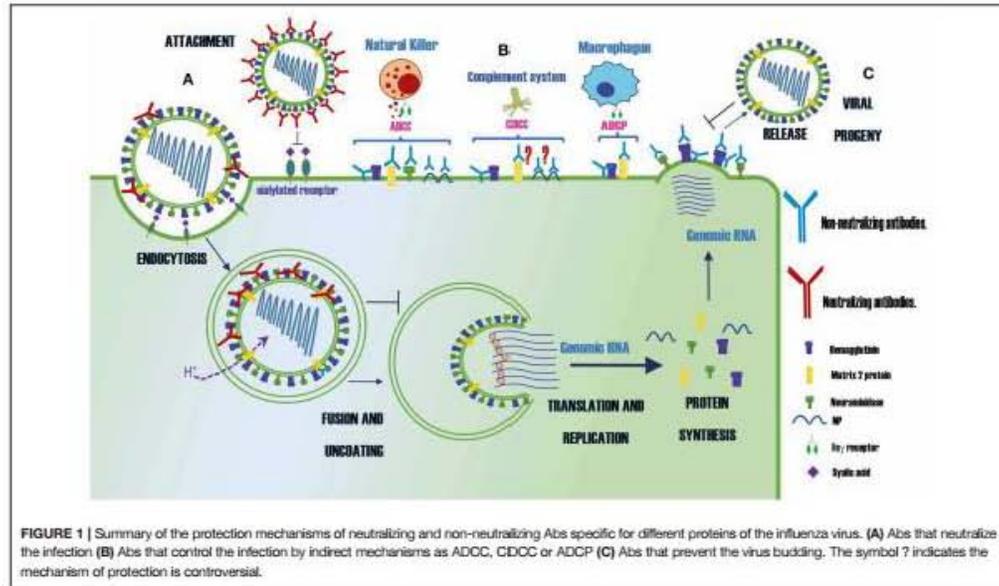
The IAV infection induces Abs against internal and non-structural proteins, such as NP, M1, PB1-F2 and others (87, 114–116). Nevertheless, the protective role of these Abs is still unknown, although few studies in mice have shown that at least the anti-NP Abs can weakly help to clear influenza infection (117, 118).

The aa sequence of NP is conserved up to 90%, among various strains of influenza and heterosubtypic immunity (HSI) induced by this protein has been fully demonstrated in the mouse model, a feature that had been totally attributed to T cells (119–121). However, Rangel-Moreno et al. reported that T cells are insufficient to achieve HSI, and they proposed that non-neutralizing Abs contribute to decrease the severity of the illness by lowering viral titers, decreasing weight loss, and promoting

TABLE 1 | Mechanisms of action of protective antibodies against influenza virus proteins in mouse and humans.

Antibodies against	Mechanism	Confirmed with:	
		Mouse Abs	Human Abs
HA (head)	Neutralizing (strain specific)	✓ ^a	✓
	Broadly neutralizing	✓	✓
	Non-neutralizing	S139 ^b (43) ^c	CH65, C05, F045-092, F026-427, D1-8 (44-47)
HA (stem)	Broadly neutralizing	Inhibit NA activity	✓ (30, 32)
		Block fusion	✓ C179 (48)
	Non-neutralizing	ADCC	✓ (51)
		ADCP	✓ (51)
		CDCC	✓ (52)
NA	Neutralizing	Inhibit NA activity	✓ (33)
	Non-neutralizing	NI-activity, interfere with viral release	✓ (76)
		ADCC	✓ (53)
M2	Non-neutralizing	ADCC	✓ 1-10 (59)
		ADCP	✓ (58)
		CDCC	✓ (101)
NP	Non-neutralizing	ADCC	✓ (57)
		CDCC	✓ Low activity (123)

a. ✓ indicates that the mechanism of action has been confirmed.
 b. mAb name.
 c. Reference in parenthesis.



the recovery of mice by helping CD8 T cells to expand after the heterosubtypic challenge (122). Furthermore, Carragher et al. analyzed the role of anti-NP Abs on HSI by vaccinating mice in the absence of T cells with recombinant nucleoprotein (rNP). They found that HSI was still present. However, it was lost when the Abs were absent, and it was recovered by transfer of rNP-immune serum (118).

Previous studies have shown that NP can be expressed on the surface of influenza virus-infected cells (123–125), however evidence for Fc-mediated effector functions of anti-NP Abs is controversial. Regarding ADCC, despite Varderven et al reported that healthy individuals had anti-NP and anti-M1 Abs capable of activating NK cells through FCγRIII, these Abs had no killing activity on target cells *in vitro* (116). Contrarily, Jegaskanda et al. found in human sera higher titers of NP-specific ADCC-Abs reactive to avian influenza strain H7N9, as compared with HA- or NA-specific ADCC-Abs reactive to the same strain. In addition, these Abs correlated with ADCC-Abs reactive to NP in the seasonal influenza viruses (H1N1 and H3N2), suggesting that they could be induced by seasonal infections or by vaccination (87). Also, Bodewes et al., reported no complement-dependent cell cytotoxicity using a human mAb specific for NP *in vitro* (124), while Yewdell et al. found low CDCC activity with five different mouse NP-mAbs in complement-mediated ⁵¹Cr microcytotoxicity assays (123).

LaMere et al. described in mice that anti-NP IgG Abs also contribute to the protection against IAV in a mechanism dependent on CD8⁺ T cells and Fc receptors (117). This can be explained because anti-NP Abs can associate with viral proteins (probably from dying infected cells) forming immune complexes (IC), which are captured by dendritic cells via FcγR, and promoting a sustained antigen presentation to CD8 T cells. All of this contributes to memory development (126). In accordance with this, when aged mice with a depressed cytotoxic T lymphocyte (CTL) response received artificial IC consisting of a NP-specific mAb and the influenza virus, the CTL response was restored, along with an enhanced dendritic cell function and an increment of IFN-γ by CD4⁺ and CD8⁺ T cells (127).

Finally, other internal and non-structural proteins like PA-X and PB1-F2 have shown to induce Abs, even though their role in protection has not been determined. In 2012, protein PA-X was identified as a product of the ribosomal frameshifting of IAV segment 3, and, at least in animal models, it modulates viral growth and suppresses antiviral responses. In 2016, the first evidence of PA-X expression in humans was the high titers

of specific Abs to this protein found in sera from patients infected during the 2003 H7N7 outbreak occurred in The Netherlands (115). Moreover, the presence of Abs against the PB1-F2 protein were confirmed by immunoprecipitation and immunofluorescence assays in human convalescent sera and experimental infected mice (114).

A summary of protective Abs against influenza virus and their mechanisms of protection is shown in Table I and Figure I, respectively.

CONCLUSION

Both neutralizing and non-neutralizing Abs can offer heterosubtypic protection against IAV. However, the Abs that recognize highly conserved epitopes are subdominant during the course of a natural infection or after vaccination. Therefore, efforts to build a universal vaccine with these antigenic determinants are being made, along with strategies for increasing their immunity. Nevertheless, despite the significant advances on the knowledge of heterosubtypic humoral immunity and the biology of B cells in animal models, further studies in humans are needed to define the viability of using them as a component of an anti-IAV universal vaccine or as a therapeutic measure.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HP-Q conceived this review and wrote the manuscript. FE-G directed the project and participated editing all the sections. DL-G created the figure and critically read the manuscript. LG-X critically read and edited the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript. This work was done as a complementary academic activity of the Ph.D. program of HP-Q.

FUNDING

This work was supported by grants from SEP-CONACYT (2015-01-257420) and SEP-PRODEP (Redes temáticas de colaboración de CA, 2015). HP-Q is a Ph.D. student of the Biochemical Sciences Program, Instituto de Biotecnología, UNAM, and was supported by a CONACYT Scholarship (375463).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jesus Martínez Barnette for his critical point of view of this review.

REFERENCES

- Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol.* (2006) 6:231–43. doi: 10.1038/nri1783
- Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* (2011) 9:590–603. doi: 10.1038/nrmicro2613
- Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology.* (1993) 196:249–55. doi: 10.1006/viro.1993.1473
- Sanz J. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med.* (2009) 82:153–9.
- Jureka AS, Kleinpeter AB, Cornilescu G, Cornilescu CC, Pettit CM. Structural basis for a novel interaction between the NS1 protein derived

- from the 1918 influenza virus and RIG-I. *Structure*. (2015) 23:2001–10. doi: 10.1016/j.str.2015.08.007
6. Klemm C, Boergeling Y, Ludwig S, Ehrhardt C. Immunomodulatory nonstructural proteins of influenza A viruses. *Trends Microbiol.* (2018) 26:624–636. doi: 10.1016/j.tim.2017.12.006
 7. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* (2001) 7:1306–12. doi: 10.1038/nm1201-1306
 8. Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG. Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol.* (2006) 7:449–55. doi: 10.1038/ni1343
 9. Cox MM, Patriarca PA, Treanor J, FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine. *Influenza Other Respir Viruses.* (2008) 2:211–9. doi: 10.1111/irj.1750-2659.2008.00053
 10. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev.* (2013) 26:476–92. doi: 10.1128/CMR.00097-12
 11. Choi YS, Baumgarth N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med.* (2008) 205:3053–64. doi: 10.1084/jem.20080979
 12. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg IA, Chen J, B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* (2000) 192:271–80. doi: 10.1084/jem.192.2.271
 13. Baumgarth N. How specific is too specific? B-cell responses to viral infections reveal the importance of breadth over depth. *Immunol Rev.* (2013) 255:82–94. doi: 10.1111/imr.12094
 14. Jayasekera JP, Moseman EA, Carroll MC. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J Virol.* (2007) 81:3487–94. doi: 10.1128/JVI.02128-06
 15. Chiu C, Ellebedy AH, Wrannert J, Ahmed R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol.* (2015) 386:381–98. doi: 10.1007/82_2014_425
 16. Heesters BA, van der Poel CE, Das A, Carroll MC. Antigen Presentation to B Cells. *Trends Immunol.* (2016) 37:844–854. doi: 10.1016/j.it.2016.10.003
 17. Lee BO, Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Hartson L, Makris M, Sprague F, et al. CD4 cell-independent antibody response promotes resolution of primary influenza infection and helps to prevent reinfection. *J Immunol.* (2005) 175:5827–38. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.5827
 18. Karosaki T, Kometani K, Ise, W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15:149–59. doi: 10.1038/nri3802
 19. Sze DM, Toellner KM, Garcia de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med.* (2000) 192:813–21. doi: 10.1084/jem.192.6.813
 20. Wang TT, Parides MK, Palese P. Seroevidence for H5N1 influenza infections in humans: meta-analysis. *Science.* (2012) 335:1463. doi: 10.1126/science.1218888
 21. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* (2013) 368:1888–97. doi: 10.1056/NEJMoa1304459
 22. Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell.* (1982) 31(2 Pt 1):417–27. doi: 10.1016/0092-8674(82)90135-0
 23. Lubeck MD, Gerhard W. Topological mapping antigenic sites on the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies. *Virology.* (1981) 113:64–72. doi: 10.1016/0042-6822(81)90136-7
 24. Yewdell JW, Gerhard W. Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Annu Rev Microbiol.* (1981) 35:185–206. doi: 10.1146/annurev.mi.35.100181.001153
 25. Gerhard W, Yewdell J, Frankel ME, Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature.* (1981) 290:713–7. doi: 10.1038/290713a0
 26. Angeletti D, Gibbs JS, Angel M, Kosik I, Hickman HD, Frank GM, et al. Defining B cell immunodominance to viruses. *Nat Immunol.* (2017) 18:456–463. doi: 10.1038/ni.3680
 27. Liu STH, Behzadi MA, Sun W, Freyn AW, Liu WC, Broecker F, et al. Antigenic sites in influenza H1 hemagglutinin display species-specific immunodominance. *J Clin Invest.* (2018) 128:4992–4996. doi: 10.1172/JCI122895
 28. Broecker F, Liu STH, Sun W, Krammer F, Simon V, Palese P. Immunodominance of antigenic site B in the hemagglutinin of the current H3N2 influenza virus in humans and mice. *J Virol.* (2018) 92:e01100–18. doi: 10.1128/JVI.01100-18
 29. Sun W, Kang DS, Zheng A, Liu STH, Broecker F, Simon V, et al. Antibody responses toward the major antigenic sites of influenza B virus hemagglutinin in mice, ferrets, and humans. *J Virol.* (2019). 93:e01673–18. doi: 10.1128/JVI.01673-18
 30. Kosik I, Yewdell JW. Influenza A virus hemagglutinin specific antibodies interfere with virion neuraminidase activity via two distinct mechanisms. *Virology.* (2017) 500:178–183. doi: 10.1016/j.virol.2016.10.024
 31. Rajendran M, Nachbagauer R, Ermler ME, Bunduc P, Amanat F, Izikson R, et al. Analysis of anti-influenza virus neuraminidase antibodies in children, adults, and the elderly by ELISA and enzyme inhibition: evidence for original antigenic sin. *MBio.* (2017) 8:16. doi: 10.1128/mBio.02281-16
 32. Wohlbold TJ, Chromikova V, Tan GS, Meade P, Amanat F, Comella P, et al. Hemagglutinin stalk- and neuraminidase-specific monoclonal antibodies protect against lethal H10N8 influenza virus infection in mice. *J Virol.* (2016) 90:851–61. doi: 10.1128/JVI.02275-15
 33. Francis T. On the Doctrine of Original Antigenic Sin. *Proc Am Philos Soc.* (1960) 104:572–578.
 34. Fazekas de St. G, Webster RG. Disquisitions of Original Antigenic Sin. I. Evidence in man. *J Exp Med.* (1966) 124:331–45. doi: 10.1084/jem.124.3.331
 35. Cobey S, Hensley SE. Immune history and influenza virus susceptibility. *Curr Opin Virol.* (2017) 22:105–111. doi: 10.1016/j.coviro.2016.12.004
 36. Ndiifon W. A simple mechanistic explanation for original antigenic sin and its alleviation by adjuvants. *J R Soc Interface.* (2015) 12:112. doi: 10.1098/rsif.2015.0627
 37. Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Wilson IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science.* (2010) 328:357–60. doi: 10.1126/science.1186430
 38. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med.* (2009) 361:1945–52. doi: 10.1056/NEJMoa0906453
 39. Krause JC, Tumpey TM, Huffman CJ, McGraw PA, Pearce MB, Tsibane T, et al. Naturally occurring human monoclonal antibodies neutralize both 1918 and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. *J Virol.* (2010) 84:3127–30. doi: 10.1128/JVI.02184-09
 40. Linderman SL, Hensley SE. Antibodies with 'original antigenic sin' properties are valuable components of secondary immune responses to influenza viruses. *PLoS Pathog.* (2016) 12:e1005806. doi: 10.1371/journal.ppat.1005806
 41. Wrannert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature.* (2008) 453:667–71. doi: 10.1038/nature06890
 42. O'Donnell CD, et al. Humans and ferrets with prior H1N1 influenza virus infections do not exhibit evidence of original antigenic sin after infection or vaccination with the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Clin Vaccine Immunol.* (2014) 21:737–46. doi: 10.1128/CLIV.00790-13
 43. Yoshida R, Igarashi M, Ozaki H, Kishida N, Tomabechi D, Kida H, et al. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog.* (2009) 5:e1000350. doi: 10.1371/journal.ppat.1000350
 44. Whittle JR, Zhang R, Khurana S, King LR, Manischewitz J, Golding H, et al. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108:14216–21. doi: 10.1073/pnas.1111497108
 45. Ekiert DC, Kashyap AK, Steed J, Rubrum A, Bhabha G, Khayat R, et al. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature.* (2012) 489:526–32. doi: 10.1038/nature11414
 46. Ohshima N, Iba Y, Kubota-Koketsu R, Asano Y, Okuno Y, Kurosawa Y. Naturally occurring antibodies in humans can neutralize a variety of

- influenza virus strains, including H3, H1, H2, and H5. *J Virol.* (2011) 85:11048–57. doi: 10.1128/JVI.05397-11
47. Benjamin E, Wang W, McAuliffe JM, Palmer-Hill FJ, Kallewaard NL, Chen Z, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody directed against a novel conserved epitope on the influenza virus H3 hemagglutinin globular head. *J Virol.* (2014) 88:6743–50. doi: 10.1128/JVI.03562-13
 48. Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, Ueda S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J Virol.* (1993) 67:2552–8.
 49. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science.* (2011) 333:850–6. doi: 10.1126/science.1205669
 50. Ekiert DC, Friesen RH, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M, Yu W, et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science.* (2011) 333:843–50. doi: 10.1126/science.1204839
 51. Ekiert DC, Bhabha G, Ehliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science.* (2009) 324:246–51. doi: 10.1126/science.1171491
 52. Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr Opin Virol.* (2012) 2:134–41. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.005
 53. Avnir Y, Tallarico AS, Zhu Q, Bennett AS, Connelly G, Sheehan J, et al. Molecular signatures of hemagglutinin stem-directed heterosubtypic human neutralizing antibodies against influenza A viruses. *PLoS Pathog.* (2014) 10:e1004103. doi: 10.1371/journal.ppat.1004103
 54. Avnir Y, Watson CT, Glanville J, Peterson EC, Tallarico AS, Bennett AS, et al. IGHV1-69 polymorphism modulates anti-influenza antibody repertoire, correlates with IGHV utilization shifts and varies by ethnicity. *Sci Rep.* (2016) 6:20842. doi: 10.1038/srep20842
 55. Yamayoshi S, Uraki R, Ito M, Kiso M, Nakatsu S, Yasuhara A, et al. A broadly reactive human anti-hemagglutinin stem monoclonal antibody that inhibits influenza A virus particle release. *EBioMedicine.* (2017) 17:182–91. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.007
 56. Palese P, Wang TT. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis. *MBio.* (2011) 2:5. doi: 10.1128/mBio.00150-11
 57. Nachbagauer R, Choi A, Hirsh A, Margine I, Iida S, Barrera A, et al. Defining the antibody cross-reactome directed against the influenza virus surface glycoproteins. *Nat Immunol.* (2017) 18:464–473. doi: 10.1038/ni.3684
 58. Cortina-Ceballos B, Godoy-Lozano EE, Téllez-Sosa J, Ovillar-Muñoz M, Sámano-Sánchez H, Aguilar-Salgado A, et al. Longitudinal analysis of the peripheral B cell repertoire reveals unique effects of immunization with a new influenza virus strain. *Genome Med.* (2015) 7:124. doi: 10.1186/s13073-015-0239-y
 59. Li GM, Chiu C, Wrammert J, McCausland M, Andrews SE, Zheng NY, et al. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2012) 109:9047–52. doi: 10.1073/pnas.1118979109
 60. Andrews SE, Huang Y, Kaur K, Popova LI, Ho IY, Pauli NT, et al. Immune history profoundly affects broadly protective B cell responses to influenza. *Sci Transl Med.* (2015) 7:316ra192. doi: 10.1126/scitranslmed.aad0522
 61. Chai N, Swern LR, Reichelt M, Chen-Harris H, Luis E, Park S, et al. Two escape mechanisms of influenza A virus to a broadly neutralizing stalk-binding antibody. *PLoS Pathog.* (2016) 12:e1005702. doi: 10.1371/journal.ppat.1005702
 62. Air GM. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses.* (2012) 6:245–56. doi: 10.1111/irv.1250-2659.2011.00304.x
 63. Schulman JL, Khakpour M, Kilbourne ED. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *J Virol.* (1968) 2:778–86.
 64. Kilbourne ED, Christenson WN, Sande M. Antibody response in man to influenza virus neuraminidase following influenza. *J Virol.* (1968) 2:761–2.
 65. Murphy BR, Kasel JA, Chanock RM. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N Engl J Med.* (1972) 286:1329–32. doi: 10.1056/NEJM19720622862502
 66. Chen YQ, Wohlbold TJ, Zheng NY, Huang M, Huang Y, Neu KE, et al. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies. *Cell.* (2018) 173:417–29 e10. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.030
 67. Marcelin G, Sandbulte MR, Webby RJ. Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *Rev Med Virol.* (2012) 22:267–79. doi: 10.1002/rmv.1713
 68. Eichelberger MC, Wan H. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015. 386: p. 275–99. doi: 10.1007/82_2014_398
 69. Marcelin G, Bland HM, Negovetich NJ, Sandbulte MR, Ellebedy AH, Webb AD, et al. Inactivated seasonal influenza vaccines increase serum antibodies to the neuraminidase of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus in an age-dependent manner. *J Infect Dis.* (2010) 202:1634–8. doi: 10.1093/infdis/jiq1084
 70. Monto AS, Kendal AP. Effect of neuraminidase antibody on Hong Kong influenza. *Lancet.* (1973) 1:623–5. doi: 10.1016/S0140-6736(73)92196-X
 71. Cox RJ. Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here? *Hum Vaccin Immunother.* (2013) 9:405–8. doi: 10.4161/hv.22908
 72. Memoli MJ, Shaw PA, Han A, Czajkowski L, Reed S, Athota R, et al. Evaluation of antihemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A(H1N1) virus healthy human challenge model. *MBio.* (2016) 7:e00417–16. doi: 10.1128/mBio.00417-16
 73. Couch RB, Atmar RL, Franco LM, Quarles JM, Wells J, Arden N, et al. Antibody correlates and predictors of immunity to naturally occurring influenza in humans and the importance of antibody to the neuraminidase. *J Infect Dis.* (2013) 207:974–81. doi: 10.1093/infdis/jit935
 74. Monto AS, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Liu M, Zhong W, et al. Antibody to influenza virus neuraminidase: an independent correlate of protection. *J Infect Dis.* (2015) 212:1191–9. doi: 10.1093/infdis/jiv195
 75. Wohlbold TJ, Nachbagauer R, Xu H, Tan GS, Hirsh A, Brokstad KA, et al. Vaccination with adjuvanted recombinant neuraminidase induces broad heterologous, but not heterosubtypic, cross-protection against influenza virus infection in mice. *MBio.* (2015) 6:e02556. doi: 10.1128/mBio.02556-14
 76. Sandbulte MR, Jimenez GS, Boon AC, Smith LR, Treanor JJ, Webby RJ. Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed humans. *PLoS Med.* (2007) 4:e59. doi: 10.1371/journal.pmed.0040059
 77. Gillim-Ross L, Subbarao K. Can immunity induced by the human influenza virus N1 neuraminidase provide some protection from avian influenza H5N1 viruses? *PLoS Med.* (2007) 4:e91. doi: 10.1371/journal.pmed.0040091
 78. Gérentes L, Kessler N, Aymard M. Difficulties in standardizing the neuraminidase content of influenza vaccines. *Dev Biol Stand.* (1999) 98:189–96; discussion 197.
 79. Getie-Keblie M, Sultana I, Eichelberger M, Alterman M. Label-free mass spectrometry-based quantification of hemagglutinin and neuraminidase in influenza virus preparations and vaccines. *Influenza Other Respir Viruses.* (2013) 7:521–30. doi: 10.1111/irv.12001
 80. Johansson BE, Kilbourne ED. Dissociation of influenza virus hemagglutinin and neuraminidase eliminates their intravirion antigenic competition. *J Virol.* (1993) 67:5721–3.
 81. Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. *J Virol.* (1989) 63:1239–46.
 82. Krammer F, Fouchier RAM, Eichelberger MC, Webby RJ, Shaw-Saliba K, Wan H, et al. NAction! how can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines? *MBio.* (2018) 9:2. doi: 10.1128/mBio.02332-17
 83. DiLillo DJ, Palese P, Wilson PC, Ravetch JV. Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for *in vivo* protection. *J Clin Invest.* (2016) 126:605–10. doi: 10.1172/JCI84428
 84. DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, Ravetch JV. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require Fcγm1b interactions for protection against influenza virus *in vivo*. *Nat Med.* (2014) 20:143–51. doi: 10.1038/nm.3443

85. Jegaskanda S, Laurie KI, Amarasekera TH, Winnall WR, Kramski M, De Rose R, et al. Age-associated cross-reactive antibody-dependent cellular cytotoxicity toward 2009 pandemic influenza A virus subtype H1N1. *J Infect Dis.* (2013) 208:1051–61. doi: 10.1093/infdis/jit294
86. Jegaskanda S, Job ER, Kramski M, Laurie K, Isitman G, de Rose R, et al. Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies in the absence of neutralizing antibodies. *J Immunol.* (2013) 190:1837–48. doi: 10.4049/jimmunol.1201574
87. Jegaskanda S, Co MDT, Cruz J, Subbarao K, Ennis FA, Terajima M. Induction of H7N9-cross-reactive antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies by human seasonal influenza A viruses that are directed toward the nucleoprotein. *J Infect Dis.* (2017) 215:818–23. doi: 10.1093/infdis/jiw629
88. Terajima M, Co MD, Cruz J, Ennis FA. High antibody-dependent cellular cytotoxicity antibody titers to H5N1 and H7N9 avian influenza A viruses in healthy US adults and older children. *J Infect Dis.* (2015) 212:1052–60. doi: 10.1093/infdis/jiv181
89. Jegaskanda S, Reading PC, Kent SJ. Influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity: toward a universal influenza vaccine. *J Immunol.* (2014) 193:469–75. doi: 10.4049/jimmunol.1400432
90. Ana-Sosa-Batiz F, Vandervlen H, Jegaskanda S, Johnston A, Rockman S, Laurie K, et al. Influenza-specific antibody-dependent phagocytosis. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0154461. doi: 10.1371/journal.pone.0154461
91. Mullarkey CE, Bailey MJ, Golubeva DA, Tan GS, Nachbagger R, He W, et al. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies induce potent phagocytosis of immune complexes by neutrophils in an Fc-dependent manner. *Mbio.* (2016) 7:5. doi: 10.1128/mbio.01624-16
92. Terajima M, Cruz J, Co MD, Lee JH, Kaur K, Wrannert J, et al. Complement-dependent lysis of influenza A virus-infected cells by broadly cross-reactive human monoclonal antibodies. *J Virol.* (2011) 85:13463–7. doi: 10.1128/JVI.015193-11
93. Cho KI, Schepens B, Seok JH, Kim S, Roose K, Lee JH, et al. Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody. *J Virol.* (2015) 89:3700–11. doi: 10.1128/JVI.02576-14
94. Deng L, Cho KI, Fiers W, Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccines. *Vaccines.* (2015) 3:105–36. doi: 10.3390/v3010105
95. Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol.* (1988) 62:2762–72.
96. Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, Lamb RA, Murphy BR. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol.* (1990) 64:1375–7.
97. Lee YN, Lee YT, Kim MC, Hwang HS, Lee JS, Kim KH, et al. Fc receptor is not required for inducing antibodies but plays a critical role in conferring protection after influenza M2 vaccination. *Immunology.* (2014) 143:300–9. doi: 10.1111/imm.12310
98. El Bakkouri K, Descamps F, De Fille M, Smet A, Festjens E, Birkett A, et al. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J Immunol.* (2011) 186:1022–31. doi: 10.4049/jimmunol.0902147
99. Simhadri VR, Dimitrova M, Mariano JL, Zenarruzabeitia O, Zhong W, Ozawa T, et al. A human anti-M2 antibody mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and cytokine secretion by resting and cytokine-primed Natural Killer (NK) cells. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0124677. doi: 10.1371/journal.pone.0124677
100. Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol.* (2004) 172:5598–605. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5598
101. Wang R, Song A, Levin J, Dennis D, Zhang NJ, Yoshida H, et al. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein. *Antiviral Res.* (2008) 80:168–77. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.06.002
102. Neiryck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med.* (1999) 5:1157–63. doi: 10.1038/13484
103. Turlay CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, Wolfson J, Tussey I, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine.* (2011) 29:5145–52. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.041
104. Tao W, Hurst BL, Shakya AK, Uddin MJ, Ingrole RS, Hernandez-Sanabria M, et al. Consensus M2e peptide conjugated to gold nanoparticles confers protection against H1N1, H3N2 and H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res.* (2017) 141:62–72. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.01.021
105. Gao X, Wang W, Li Y, Zhang S, Duan Y, Xing L, et al. Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge. *Antiviral Res.* (2013) 98:4–11. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.01.010
106. Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, Misplon JA, Liu T, Ye Z, et al. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis.* (2007) 13:426–35. doi: 10.3201/eid1303061125
107. Kim YJ, Ko EJ, Kim MC, Lee YN, Kim KH, Jung YJ, et al. Roles of antibodies to influenza A virus hemagglutinin, neuraminidase, and M2e in conferring cross protection. *Biochem Biophys Res Commun.* (2017) 493:393–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.011
108. Feng J, Zhang M, Mozdzanowska K, Zharikova D, Hoff H, Wunner W, et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Viral J.* (2006) 3:102. doi: 10.1186/1743-422X-3-102
109. Zhong W, Reed C, Blair PJ, Katz JM, Hancock K, et al. Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in humans. *J Infect Dis.* (2014) 209:986–94.
110. Ramos EL, Mitcham JL, Koller TD, Bonavia A, Usner DW, Balaratnam G, et al. Efficacy and safety of treatment with an anti-m2e monoclonal antibody in experimental human influenza. *J Infect Dis.* (2015) 211:1038–44. doi: 10.1093/infdis/jiu539
111. *Comparative Safety and Immunogenicity of 1.0 µg Intramuscular (i.m.) and 2.0 µg Subcutaneous (s.c.) Dosing With VAX102 (M2e-flagellin) Universal Influenza Vaccine in Healthy Adults.* Available online at: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00921947> (accessed November 13, 2017).
112. *Safety Study of Recombinant M2e Influenza-A Vaccine in Healthy Adults.* Available online at: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00819013> (accessed November 13, 2017).
113. Tsybalova LM, Stepanova LA, Kuprianov VV, Blokhina EA, Potapchuk MV, Korotkov AV, et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine.* (2015) 33:3398–406. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.073
114. Krejnosová I, Gocníkova H, Bystrická M, Blaskovicová H, Poláková K, Yewdell J, et al. Antibodies to PB1-F2 protein are induced in response to influenza A virus infection. *Arch Virol.* (2009) 154:1599–604. doi: 10.1007/s00705-009-0479-5
115. Khurana S, Chung KY, Coyle EM, Meijer A, Golding H. Antigenic fingerprinting of antibody response in humans following exposure to highly pathogenic H7N7 avian influenza virus: evidence for Anti-PA-X antibodies. *J Virol.* (2016) 90:9383–93. doi: 10.1128/JVI.01408-16
116. Vandervlen HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, et al. What lies beneath: antibody dependent natural killer cell activation by antibodies to internal influenza virus proteins. *EBioMedicine.* (2016) 8:277–90. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.029
117. LaMere MW, Lam HT, Moquin A, Haynes L, Lund FE, Randall TD, et al. Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus. *J Immunol.* (2011) 186:4331–9. doi: 10.4049/jimmunol.1003057
118. Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson I, Randall TD. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol.* (2008) 181:4168–76. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4168
119. Shu LL, Bean WJ, Webster RG. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *J Virol.* (1993) 67:2723–9.
120. Subbarao K, Murphy BR, Fauci AS. Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity.* (2006) 24:5–9. doi: 10.1016/j.immuni.2005.12.005

121. Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1985) 82:1785-9. doi: 10.1073/pnas.82.6.1785
122. Rangel-Moreno J, Carragher DM, Misra RS, Kasser K, Hartson I, Moquin A, et al. B cells promote resistance to heterosubtypic strains of influenza via multiple mechanisms. *J Immunol.* (2008) 180:454-63. doi: 10.4049/jimmunol.180.1.454
123. Yewdell JW, Frank E, Gerhard W. Expression of influenza A virus internal antigens on the surface of infected P815 cells. *J Immunol.* (1981) 126:1814-9.
124. Bodewes R, Geelhoed-Mieras MM, Wrammert J, Ahmed R, Wilson PC, Fouchier RA, et al. *In vitro* assessment of the immunological significance of a human monoclonal antibody directed to the influenza A virus nucleoprotein. *Clin Vaccine Immunol.* (2013) 20:1333-7. doi: 10.1128/CVI.00339-13
125. Virelizier JL, Allison AC, Oxford JS, Schild GC. Early presence of ribonucleoprotein antigen on surface of influenza virus-infected cells. *Nature.* (1977) 266:52-4. doi: 10.1038/266052a0
126. León B, Ballesteros-Tato A, Randall TD, Lund FE. Prolonged antigen presentation by immune complex-binding dendritic cells programs the proliferative capacity of memory CD8 T cells. *J Exp Med.* (2014) 211:1637-55. doi: 10.1084/jem.20131692
127. Zheng B, Zhang Y, He H, Marinova E, Switzer K, Wansley D, et al. Rectification of age-associated deficiency in cytotoxic T cell response to influenza A virus by immunization with immune complexes. *J Immunol.* (2007) 179:6153-9. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.6153

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Padilla-Quirarte, Lopez-Guerrero, Gutierrez-Xicotencatl and Esquivel-Guadarrama. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organization WH. Seasonal Influenza 2019 [July 18, 2019]. Available from: https://www.who.int/ith/diseases/influenza_seasonal/en/.
2. Organization WH. Influenza Fact Sheet No. 211 2014. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
3. Bouvier NM, Lowen AC. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*. 2010;2(8):1530-63.
4. Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annual review of medicine*. 2013;64:189-202.
5. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS pathogens*. 2013;9(2):e1003176.
6. Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(8):590-603.
7. Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG. Influenza and the challenge for immunology. *Nature immunology*. 2006;7(5):449-55.
8. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens*. 2013;9(10):e1003657.
9. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*. 1991;182(2):475-85.
10. Air GM. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(12):7639-43.
11. Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of virology*. 1988;62(8):2762-72.
12. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010;463(7282):813-7.
13. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *The EMBO journal*. 1994;13(13):3158-65.
14. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 4:D49-53.
15. Roy AM, Parker JS, Parrish CR, Whittaker GR. Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: involvement of dynamin. *Virology*. 2000;267(1):17-28.
16. Chen C, Zhuang X. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(33):11790-5.
17. Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(16):9280-5.
18. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale journal of biology and medicine*. 2009;82(4):153-9.
19. Engelhardt OG, Smith M, Fodor E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *Journal of virology*. 2005;79(9):5812-8.

20. Engelhardt OG, Fodor E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Reviews in medical virology*. 2006;16(5):329-45.
21. York A, Fodor E. Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA biology*. 2013;10(8):1274-82.
22. Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, Skehel JJ. Transcription of the influenza virus genome. *Virology*. 1977;83(2):337-55.
23. Hutchinson EC, Fodor E. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*. 2013;5(10):2424-46.
24. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 2011;411(2):229-36.
25. Wisskirchen C, Ludersdorfer TH, Muller DA, Moritz E, Pavlovic J. The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. *Journal of virology*. 2011;85(17):8646-55.
26. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(5):315-28.
27. Pang IK, Iwasaki A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends in immunology*. 2011;32(1):34-41.
28. Pulendran B, Maddur MS. Innate immune sensing and response to influenza. *Current topics in microbiology and immunology*. 2015;386:23-71.
29. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nature immunology*. 2015;16(1):36-44.
30. Schneider C, Nobs SP, Heer AK, Kurrer M, Klinke G, van Rooijen N, et al. Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. *PLoS pathogens*. 2014;10(4):e1004053.
31. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, et al. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nature immunology*. 2008;9(9):1074-83.
32. Ghosh S, Gregory D, Smith A, Kobzik L. MARCO regulates early inflammatory responses against influenza: a useful macrophage function with adverse outcome. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(5):1036-44.
33. Seo SU, Kwon HJ, Ko HJ, Byun YH, Seong BL, Uematsu S, et al. Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS pathogens*. 2011;7(2):e1001304.
34. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annual review of immunology*. 2013;31:163-94.
35. Stein-Streilein J, Bennett M, Mann D, Kumar V. Natural killer cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection. *Journal of immunology*. 1983;131(6):2699-704.
36. Verbist KC, Rose DL, Cole CJ, Field MB, Klonowski KD. IL-15 participates in the respiratory innate immune response to influenza virus infection. *PLoS one*. 2012;7(5):e37539.
37. Gazit R, Gruda R, Elboim M, Arnon TI, Katz G, Achdout H, et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nature immunology*. 2006;7(5):517-23.
38. Zhou G, Juang SW, Kane KP. NK cells exacerbate the pathology of influenza virus infection in mice. *European journal of immunology*. 2013;43(4):929-38.
39. de Vries RD, Nieuwkoop NJ, Pronk M, de Bruin E, Leroux-Roels G, Huijskens EGW, et al. Influenza virus-specific antibody dependent cellular cytotoxicity induced by vaccination or natural infection. *Vaccine*. 2017;35(2):238-47.
40. Glasner A, Zurunic A, Meninger T, Lenac Rovis T, Tsukerman P, Bar-On Y, et al. Elucidating the mechanisms of influenza virus recognition by *Ncr1*. *PLoS one*. 2012;7(5):e36837.

41. Kumar P, Thakar MS, Ouyang W, Malarkannan S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal immunology*. 2013;6(1):69-82.
42. Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research*. 2011;162(1-2):19-30.
43. Waithman J, Mintern JD. Dendritic cells and influenza A virus infection. *Virulence*. 2012;3(7):603-8.
44. Hufford MM, Kim TS, Sun J, Braciale TJ. The effector T cell response to influenza infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2015;386:423-55.
45. Braciale TJ, Sun J, Kim TS. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):295-305.
46. Sun J, Braciale TJ. Role of T cell immunity in recovery from influenza virus infection. *Current opinion in virology*. 2013;3(4):425-9.
47. Hillaire ML, Rimmelzwaan GF, Kreijtz JH. Clearance of influenza virus infections by T cells: risk of collateral damage? *Current opinion in virology*. 2013;3(4):430-7.
48. Choi YS, Baumgarth N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):3053-64.
49. Chiu C, Ellebedy AH, Wrarmert J, Ahmed R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Current topics in microbiology and immunology*. 2015;386:381-98.
50. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):149-59.
51. Valkenburg SA, Rutigliano JA, Ellebedy AH, Doherty PC, Thomas PG, Kedzierska K. Immunity to seasonal and pandemic influenza A viruses. *Microbes and infection*. 2011;13(5):489-501.
52. Grebe KM, Yewdell JW, Bennink JR. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? *Microbes and infection*. 2008;10(9):1024-9.
53. Schulman JL, Kilbourne ED. Induction of Partial Specific Heterotypic Immunity in Mice by a Single Infection with Influenza a Virus. *Journal of bacteriology*. 1965;89:170-4.
54. Epstein SL. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(1):49-53.
55. McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *The New England journal of medicine*. 1983;309(1):13-7.
56. Stanekova Z, Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology journal*. 2010;7:351.
57. Hillaire ML, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:939860.
58. Kaminski DA, Lee FE. Antibodies against conserved antigens provide opportunities for reform in influenza vaccine design. *Frontiers in immunology*. 2011;2:76.
59. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(3):476-92.
60. Zhang H, Wang L, Compans RW, Wang BZ. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses*. 2014;6(5):1974-91.
61. Lillie PJ, Berthoud TK, Powell TJ, Lambe T, Mullarkey C, Spencer AJ, et al. Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(1):19-25.

62. Atsmon J, Kate-Ilovitz E, Shaikevich D, Singer Y, Volokhov I, Haim KY, et al. Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *Journal of clinical immunology*. 2012;32(3):595-603.
63. Deng L, Cho KJ, Fiers W, Saelens X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines*. 2015;3(1):105-36.
64. Feng J, Zhang M, Mozdzanowska K, Zharikova D, Hoff H, Wunner W, et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virology journal*. 2006;3:102.
65. Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature medicine*. 1999;5(10):1157-63.
66. Tao W, Hurst BL, Shakya AK, Uddin MJ, Ingrole RS, Hernandez-Sanabria M, et al. Consensus M2e peptide conjugated to gold nanoparticles confers protection against H1N1, H3N2 and H5N1 influenza A viruses. *Antiviral research*. 2017;141:62-72.
67. Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, Misplon JA, Liu T, Ye Z, et al. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(3):426-35.
68. Gao X, Wang W, Li Y, Zhang S, Duan Y, Xing L, et al. Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge. *Antiviral research*. 2013;98(1):4-11.
69. Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM, et al. New vaccines against influenza virus. *Clinical and experimental vaccine research*. 2014;3(1):12-28.
70. Eliasson DG, El Bakkouri K, Schon K, Ramne A, Festjens E, Lowenadler B, et al. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. *Vaccine*. 2008;26(9):1243-52.
71. Schultz-Cherry S. Is it possible? A different approach to creating a universal influenza vaccine. *mBio*. 2015;6(5):e01580-15.
72. Thomson CA, Wang Y, Jackson LM, Olson M, Wang W, Liavonchanka A, et al. Pandemic H1N1 Influenza Infection and Vaccination in Humans Induces Cross-Protective Antibodies that Target the Hemagglutinin Stem. *Frontiers in immunology*. 2012;3:87.
73. Krammer F, Pica N, Hai R, Tan GS, Palese P. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Are Boosted following Sequential Infection with Seasonal and Pandemic H1N1 Influenza Virus in Mice. *Journal of virology*. 2012;86(19):10302-7.
74. Hai R, Krammer F, Tan GS, Pica N, Eggink D, Maamary J, et al. Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes. *Journal of virology*. 2012;86(10):5774-81.
75. Wohlbold TJ, Nachbagauer R, Margine I, Tan GS, Hirsh A, Krammer F. Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses. *Vaccine*. 2015;33(29):3314-21.
76. Eggink D, Goff PH, Palese P. Guiding the immune response against influenza virus hemagglutinin toward the conserved stalk domain by hyperglycosylation of the globular head domain. *Journal of virology*. 2014;88(1):699-704.
77. Macri C, Dumont C, Johnston AP, Mintern JD. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clinical & translational immunology*. 2016;5(3):e66.
78. Cohn L, Delamarre L. Dendritic cell-targeted vaccines. *Frontiers in immunology*. 2014;5:255.
79. Snider DP, Segal DM. Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates. *Journal of immunology*. 1987;139(5):1609-16.
80. Carayanniotis G, Barber BH. Adjuvant-free IgG responses induced with antigen coupled to antibodies against class II MHC. *Nature*. 1987;327(6117):59-61.

81. Tacken PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(10):790-802.
82. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(2):77-84.
83. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(7):465-79.
84. Unger WW, van Kooyk Y. 'Dressed for success' C-type lectin receptors for the delivery of glyco-vaccines to dendritic cells. *Current opinion in immunology*. 2011;23(1):131-7.
85. Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, Meltzer J, Mirza A, Sasagawa T, et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cellular immunology*. 1995;163(1):148-56.
86. Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International immunology*. 2006;18(6):857-69.
87. Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular immunology*. 2009;46(6):1229-39.
88. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(6):815-24.
89. Castro FV, Tutt AL, White AL, Teeling JL, James S, French RR, et al. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *European journal of immunology*. 2008;38(8):2263-73.
90. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*. 2003;101(12):4862-9.
91. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(12):1627-38.
92. Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(3):599-606.
93. Amorim KN, Rampazo EV, Antonialli R, Yamamoto MM, Rodrigues MM, Soares IS, et al. The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205(+) dendritic cells. *Scientific reports*. 2016;6:39250.
94. Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Plett-Torres T, Pedroza-Saavedra A, Gonzalez-Jaimes A, Chihu-Amparan L, et al. Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine*. 2015;33(35):4228-37.
95. Tsuji T, Matsuzaki J, Kelly MP, Ramakrishna V, Vitale L, He LZ, et al. Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+ T cell responses with broad antigen specificity. *Journal of immunology*. 2011;186(2):1218-27.
96. Stylianou E, Pepponi I, van Dolleweerd CJ, Paul MJ, Ma JK, Reljic R. Exploring the vaccine potential of Dec-205 targeting in Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Vaccine*. 2011;29(12):2279-86.
97. Do Y, Didierlaurent AM, Ryu S, Koh H, Park CG, Park S, et al. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor. *Vaccine*. 2012;30(45):6359-67.
98. Coconi-Linares N, Ortega-Davila E, Lopez-Gonzalez M, Garcia-Machorro J, Garcia-Cordero J, Steinman RM, et al. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 2013;31(19):2366-71.

99. Ring S, Maas M, Nettelbeck DM, Enk AH, Mahnke K. Targeting of autoantigens to DEC205(+) dendritic cells in vivo suppresses experimental allergic encephalomyelitis in mice. *Journal of immunology*. 2013;191(6):2938-47.
100. Mukherjee G, Geliebter A, Babad J, Santamaria P, Serreze DV, Freeman GJ, et al. DEC-205-mediated antigen targeting to steady-state dendritic cells induces deletion of diabetogenic CD8(+) T cells independently of PD-1 and PD-L1. *International immunology*. 2013;25(11):651-60.
101. Saluja SS, Hanlon DJ, Sharp FA, Hong E, Khalil D, Robinson E, et al. Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:5231-46.
102. Silva-Sanchez A, Meza-Perez S, Flores-Langarica A, Donis-Maturano L, Estrada-Garcia I, Calderon-Amador J, et al. ESAT-6 Targeting to DEC205+ Antigen Presenting Cells Induces Specific-T Cell Responses against ESAT-6 and Reduces Pulmonary Infection with Virulent Mycobacterium tuberculosis. *PloS one*. 2015;10(4):e0124828.
103. Jing M, Wang J, Zhu S, Ao F, Wang L, Han T, et al. Development of a more efficient hepatitis B virus vaccine by targeting hepatitis B virus preS to dendritic cells. *Vaccine*. 2016;34(4):516-22.
104. Graham JP, Authie P, Yu CI, Zurawski SM, Li XH, Marches F, et al. Targeting dendritic cells in humanized mice receiving adoptive T cells via monoclonal antibodies fused to Flu epitopes. *Vaccine*. 2016;34(41):4857-65.
105. Wadwa M, Klopfleisch R, Buer J, Westendorf AM. Targeting Antigens to Dec-205 on Dendritic Cells Induces Immune Protection in Experimental Colitis in Mice. *European journal of microbiology & immunology*. 2016;6(1):1-8.
106. Jauregui-Zuniga D, Pedraza-Escalona M, Espino-Solis GP, Quintero-Hernandez V, Olvera-Rodriguez A, Diaz-Salinas MA, et al. Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: Hemagglutinin of avian influenza virus example. *Research in veterinary science*. 2017;111:55-62.
107. Antonio-Herrera L, Badillo-Godinez O, Medina-Contreras O, Tepale-Segura A, Garcia-Lozano A, Gutierrez-Xicotencatl L, et al. The Nontoxic Cholera B Subunit Is a Potent Adjuvant for Intradermal DC-Targeted Vaccination. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2212.
108. Yewdell JW. To dream the impossible dream: universal influenza vaccination. *Current opinion in virology*. 2013;3(3):316-21.
109. Kim SH, Kim JY, Choi Y, Nguyen HH, Song MK, Chang J. Mucosal vaccination with recombinant adenovirus encoding nucleoprotein provides potent protection against influenza virus infection. *PloS one*. 2013;8(9):e75460.
110. Ma JH, Yang FR, Yu H, Zhou YJ, Li GX, Huang M, et al. An M2e-based synthetic peptide vaccine for influenza A virus confers heterosubtypic protection from lethal virus challenge. *Virology journal*. 2013;10:227.
111. Muramatsu M, Yoshida R, Miyamoto H, Tomabechi D, Kajihara M, Maruyama J, et al. Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization with inactivated influenza viruses in mice. *PloS one*. 2013;8(8):e71534.
112. Park KS, Seo YB, Lee JY, Im SJ, Seo SH, Song MS, et al. Complete protection against a H5N2 avian influenza virus by a DNA vaccine expressing a fusion protein of H1N1 HA and M2e. *Vaccine*. 2011;29(33):5481-7.
113. Kim MC, Lee JS, Kwon YM, O E, Lee YJ, Choi JG, et al. Multiple heterologous M2 extracellular domains presented on virus-like particles confer broader and stronger M2 immunity than live influenza A virus infection. *Antiviral research*. 2013;99(3):328-35.
114. Frace AM, Klimov AI, Rowe T, Black RA, Katz JM. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. *Vaccine*. 1999;17(18):2237-44.

115. Anhlan D, Hrinicius ER, Scholtissek C, Ludwig S. Introduction of silent mutations into the NP gene of influenza A viruses as a possible strategy for the creation of a live attenuated vaccine. *Vaccine*. 2012;30(30):4480-9.
116. Tamura S, Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Japanese journal of infectious diseases*. 2004;57(6):236-47.
117. Caminschi I, Shortman K. Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. *Trends in immunology*. 2012;33(2):71-7.
118. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 1995;375(6527):151-5.
119. Brown EG. Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8. *Journal of virology*. 1990;64(9):4523-33.
120. Narasaraju T, Sim MK, Ng HH, Phoon MC, Shanker N, Lal SK, et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes and infection*. 2009;11(1):2-11.
121. Nagy Z, Rajnavolgyi E, Hollosi M, Toth GK, Varadi G, Penke B, et al. The intersubunit region of the influenza virus haemagglutinin is recognized by antibodies during infection. *Scandinavian journal of immunology*. 1994;40(3):281-91.
122. Jackson DC, Drummer HE, Brown LE. Conserved determinants for CD4+ T cells within the light chain of the H3 hemagglutinin molecule of influenza virus. *Virology*. 1994;198(2):613-23.
123. Gao XM, Liew FY, Tite JP. Identification and characterization of T helper epitopes in the nucleoprotein of influenza A virus. *Journal of immunology*. 1989;143(9):3007-14.
124. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology*. 2016;5(2):85-6.
125. Eliasson DG, Omokanye A, Schon K, Wenzel UA, Bernasconi V, Bemark M, et al. M2e-tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal immunology*. 2018;11(1):273-89.
126. Lee YN, Kim MC, Lee YT, Kim YJ, Kang SM. Mechanisms of Cross-protection by Influenza Virus M2-based Vaccines. *Immune network*. 2015;15(5):213-21.
127. Rajnavolgyi E, Nagy Z, Kurucz I, Gogolak P, Toth GK, Varadi G, et al. T cell recognition of the posttranslationally cleaved intersubunit region of influenza virus hemagglutinin. *Molecular immunology*. 1994;31(18):1403-14.
128. Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, Inaba K, Steinman RM. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cellular immunology*. 1995;163(1):157-62.
129. Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *The Journal of experimental medicine*. 1986;163(4):981-97.
130. Swiggard WJ, Mirza A, Nussenzweig MC, Steinman RM. DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cellular immunology*. 1995;165(2):302-11.
131. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 2013;38(1):13-25.
132. Quah BJ, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010(44).

133. Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, Lamb RA, Murphy BR. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *Journal of virology*. 1990;64(3):1375-7.
134. Kim YJ, Ko EJ, Kim MC, Lee YN, Kim KH, Jung YJ, et al. Roles of antibodies to influenza A virus hemagglutinin, neuraminidase, and M2e in conferring cross protection. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;493(1):393-8.
135. Schepens B, De Vlioger D, Saelens X. Vaccine options for influenza: thinking small. *Current opinion in immunology*. 2018;53:22-9.
136. Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *Journal of immunology*. 2004;172(9):5598-605.
137. El Bakkouri K, Descamps F, De Filette M, Smet A, Festjens E, Birkett A, et al. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *Journal of immunology*. 2011;186(2):1022-31.
138. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;391(10127):1285-300.
139. Bozzacco L, Trumpfheller C, Huang Y, Longhi MP, Shimeliovich I, Schauer JD, et al. HIV gag protein is efficiently cross-presented when targeted with an antibody towards the DEC-205 receptor in Flt3 ligand-mobilized murine DC. *European journal of immunology*. 2010;40(1):36-46.
140. Gurer C, Strowig T, Brilot F, Pack M, Trumpfheller C, Arrey F, et al. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood*. 2008;112(4):1231-9.
141. Leung CS, Maurer MA, Meixlsperger S, Lippmann A, Cheong C, Zuo J, et al. Robust T-cell stimulation by Epstein-Barr virus-transformed B cells after antigen targeting to DEC-205. *Blood*. 2013;121(9):1584-94.
142. Maaske A, Devos FC, Niezold T, Lapuente D, Tannapfel A, Vanoirbeek JA, et al. Mucosal expression of DEC-205 targeted allergen alleviates an asthmatic phenotype in mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;237:14-22.
143. Petzold C, Schallenberg S, Stern JN, Kretschmer K. Targeted antigen delivery to DEC-205(+) dendritic cells for tolerogenic vaccination. *The review of diabetic studies : RDS*. 2012;9(4):305-18.
144. Corse E, Gottschalk RA, Allison JP. Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *Journal of immunology*. 2011;186(9):5039-45.
145. Kim C, Wilson T, Fischer KF, Williams MA. Sustained interactions between T cell receptors and antigens promote the differentiation of CD4(+) memory T cells. *Immunity*. 2013;39(3):508-20.
146. Nagaoka M, Hatta Y, Kawaoka Y, Malherbe LP. Antigen signal strength during priming determines effector CD4 T cell function and antigen sensitivity during influenza virus challenge. *Journal of immunology*. 2014;193(6):2812-20.
147. Van den Hoecke S, Ehrhardt K, Kolpe A, El Bakkouri K, Deng L, Grootaert H, et al. Hierarchical and Redundant Roles of Activating FcγR3s in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies. *Journal of virology*. 2017;91(7).
148. Lee YN, Lee YT, Kim MC, Hwang HS, Lee JS, Kim KH, et al. Fc receptor is not required for inducing antibodies but plays a critical role in conferring protection after influenza M2 vaccination. *Immunology*. 2014;143(2):300-9.
149. Lee YT, Ko EJ, Lee Y, Kim KH, Kim MC, Lee YN, et al. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *PloS one*. 2018;13(1):e0190868.

150. Guo Y, He L, Song N, Li P, Sun S, Zhao G, et al. Highly conserved M2e and hemagglutinin epitope-based recombinant proteins induce protection against influenza virus infection. *Microbes and infection*. 2017;19(12):641-7.
151. Schotsaert M, Ysenbaert T, Neyt K, Ibanez LI, Bogaert P, Schepens B, et al. Natural and long-lasting cellular immune responses against influenza in the M2e-immune host. *Mucosal immunology*. 2013;6(2):276-87.
152. Rappazzo CG, Watkins HC, Guarino CM, Chau A, Lopez JL, DeLisa MP, et al. Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in BALB/c mice. *Vaccine*. 2016;34(10):1252-8.
153. Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang WS, Chen YH. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine*. 2007;25(52):8868-73.
154. Herve PL, Raliou M, Bourdieu C, Dubuquoy C, Petit-Camurdan A, Bertho N, et al. A novel subnucleocapsid nanoplatfom for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *Journal of virology*. 2014;88(1):325-38.
155. Kamphorst AO, Guermonprez P, Dudziak D, Nussenzweig MC. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *Journal of immunology*. 2010;185(6):3426-35.
156. Pasqual G, Angelini A, Victora GD. Triggering positive selection of germinal center B cells by antigen targeting to DEC-205. *Methods in molecular biology*. 2015;1291:125-34.
157. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*. 2010;143(4):592-605.
158. Zhong W, Reed C, Blair PJ, Katz JM, Hancock K, Influenza Serology Working G. Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in humans. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(7):986-94.
159. Wolf AI, Mozdzanowska K, Williams KL, Singer D, Richter M, Hoffmann R, et al. Vaccination with M2e-based multiple antigenic peptides: characterization of the B cell response and protection efficacy in inbred and outbred mice. *PLoS one*. 2011;6(12):e28445.
160. Park HY, Tan PS, Kavishna R, Ker A, Lu J, Chan CEZ, et al. Enhancing vaccine antibody responses by targeting Clec9A on dendritic cells. *NPJ vaccines*. 2017;2:31.
161. Deloizy C, Fossum E, Barnier-Quer C, Urien C, Chrun T, Duval A, et al. The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin. *Scientific reports*. 2017;7(1):7639.