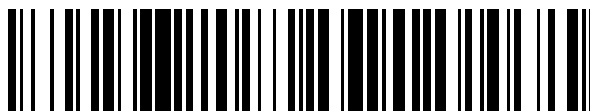


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 421**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2012 E 12712389 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2689016**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas en forma particulada y métodos para producir las mismas**

30 Prioridad:

22.03.2011 EP 11159233

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

11.05.2015

73 Titular/es:

MUCOSIS B.V. (100.0%)

L.J. Zielstraweg 1

9713 GX Groningen, NL

72 Inventor/es:

LEENHOUTS, CORNELIS, JOHANNES;

HAIJEMA, BERT, JAN;

VAN ROOSMALEN, MAARTEN, LEONARDUS;

ROTTIER, PETRUS, JOSEPHUS, MARIE;

DE HAAN, CORNELIS, ALEXANDER, MARIA y

BOSCH, BEREND, JAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 535 421 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción

Composiciones inmunogénicas en forma particulada y métodos para producir las mismas

- 5 La invención se relaciona con el campo de la inmunología y el desarrollo de vacunas, particularmente con el desarrollo de vacunas basadas en oligómeros antígenos nativos.

10 Muchas proteínas expuestas en la superficie de patógenos y células tumorales son funcionales como oligómeros. Ejemplos de patógenos son, por ejemplo, la hemaglutinina del virus de la influenza (HA) que se produce en los viriones como homotrímero, y la neuraminidasa (NA) como un homotetrámero. Además, las glicoproteínas gp140/gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son un homotrímero en su forma activa. Asimismo, las glicoproteínas G y F del virus respiratorio sincitial (RSV) se producen en los viriones como homooligómeros tetraméricos y triméricos, respectivamente. Asimismo, las puntas del coronavirus consisten de homotrímeros como es el caso para los coronavirus respiratorio humano y coronavirus SARS. Los ejemplos para las células tumorales son, por ejemplo, los receptores tirosina cinasa (RTKs). Los RTKs son receptores de superficie celular de alta afinidad para muchos factores de crecimiento polipeptídicos, citocinas y hormonas. Los receptores de los factores de crecimiento incluyen: receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Los receptores de las hormonas incluyen: receptor de andrógeno y receptor de estrógeno. Un ejemplo de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es la familia de proteínas ErbB de cuatro RTKs estructuralmente relacionados. Los cuatro miembros de la familia de proteína ErbB son capaces de formar homodímeros, heterodímeros, y posiblemente oligómeros de orden superior tras la activación por un subconjunto de ligandos potenciales del factor de crecimiento. ErbB-1 se sobre expresa en muchos cánceres. La familia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) consiste de PDGF-A, -B, -C y -D, que forman ya sea homo o heterodímeros (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD). Los cuatro PDGFs son inactivos en sus formas monoméricas. Tales proteínas oligoméricas de patógenos y células tumorales frecuentemente están involucradas en la patogenicidad y la inmunogenicidad de la entidad causante de la enfermedad (virus, bacterias, parásitos) o en el desarrollo del cáncer, respectivamente, y son por lo tanto objetivos importantes para el desarrollo de vacunas.

15 Sin embargo, durante la preparación de la vacuna la integridad y, por lo tanto, la antigenicidad de estas estructuras oligoméricas puede verse afectada negativamente por ejemplo si el proceso de fabricación implica la inactivación del patógeno. Alternativamente, el estado oligomérico del antígeno puede no obtenerse debido al proceso de producción usado para la fabricación (recombinante) de vacunas de subunidades. En ambos casos, esto puede resultar en la agregación o disociación en un estado monomérico y/o mal plegado de las proteínas.

20 Los epitopos conformacionales incrustados en las estructuras cuaternarias de oligómeros pueden contribuir críticamente a la inmunogenicidad (Weldon y otros PLoS One 5 [2010], pii: e12466). Du y otros (Virology 395 [2009], 33-44) por ejemplo, encontraron que la inmunización de conejos no proporcionó evidencia de que construcciones de gp140 trimerizadas indujeran de manera significativa el aumento de anticuerpos neutralizantes contra varios pseudovirus VIH-1, en comparación con la gp140 que carece de un motivo de trimerización. Por otra parte, Grundner y otros (Virology 331 [2005], 33-46) mostraron que la inmunización de conejos con el trímero de gp140 provocaron anticuerpos neutralizantes de mayor potencia y amplitud que lo que hicieron ya sea gp120 o proteoliposomas en fase sólida que contenían un Env de escisión defectuoso. Además Wei y otros (J. Virol. 82 [2008], 6200-6208) demostraron que puntas virales triméricas sirven como proteínas inmunógenas óptimas para provocar anticuerpos neutralizantes contra aislados del virus H5N1. En otras notas, Bosch y otros (J. Virol. 84 [2010], 10366-10374) proporcionaron evidencias de que la combinación HA trimérica soluble y NA tetramérica del virus de la influenza A(H1N1) de origen de la pandemia porcina de 2009 en presencia de adyuvante proporciona protección contra la infección en hurones.

25 Por lo tanto, es concebible que la presencia de antígenos proteínas oligoméricas nativas en las vacunas es fundamental para su capacidad protectora. En muchos casos, la oligomerización está determinada por un subdominio que tiene fuertes propiedades de oligomerización. Además en muchos casos, tal dominio de oligomerización de los antígenos de la vacuna está incrustado en una membrana. Para posibilitar la oligomerización de subunidades de antígenos de la vacuna en ausencia de un entorno de lípidos, subdominios de oligomerización nativos se pueden sustituir por un motivo de espiral enrollada heterólogo con propiedades que inducen conformación similar. Ejemplos de tales motivos que se aplicaron con éxito para obtener estructuras de proteínas oligoméricas nativas son una forma del factor de transcripción GCN4 de 32 aminoácidos (GCN), un dominio de trimerización de 27 aminoácidos del C-terminal de fibrina del bacteriófago T4 (T4F), y un dominio de trimerización soluble de proteína de la matriz del cartílago de pollo (CART) (Selvarajah y otros, AIDS Res. Hum. Retrovir. 24 [2008] 301-314; Yang y otros, J. Virol. 74 [2000], 5716-5725; Yang y otros, J. Virol. 76 [2002], 4634-4642).

30 Por lo tanto, la tecnología para producir antígenos de vacunas de subunidades oligoméricas nativas está disponible. No obstante, se conoce que antígenos de vacunas de subunidades solubles son poco inmunogénicos generalmente y necesitan adyuvantes y/o un sistema de portador particulado con el fin de aumentar las respuestas inmunes robustas. En el pasado

reciente hubo un interés creciente en el desarrollo de nuevos sistemas de presentación de antígeno no replicante con el fin de aumentar la inmunogenicidad de antígenos que se podrían usar como vacunas. Muchos de estos sistemas están diseñados de tal manera para presentar el antígeno como una estructura particulada polivalente. Algunos de los ejemplos bien apreciados son las de las proteínas del núcleo y de superficie del virus de la hepatitis B genéticamente fusionado a los antígenos del virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Clarke y otros, *Nature* 330 [1987], 381-384) y el VIH (Michel y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 [1988], 7957-7961; Schlienger y otros, *J. Virol.* 66 [1992], 2570-2576); el desarrollo de partículas tipo virus Ty (VLPs) como portadores de antígenos (Adams y otros, *Nature* 329 [1987], 68-70) donde los antígenos se fusionan genéticamente al C-terminal de la proteína codificada por el gen TYA del retro-transposón Ty de levadura para formar híbridos Ty-VLPs, partículas tipo parvovirus (Miyamura y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91 [1994], 8507-8511). Estas tecnologías aseguran que el antígeno en cuestión se presenta en múltiples copias en partículas relativamente grandes.

Otros portadores particulados para antígenos conocidos son los virosomas que son complejos compuestos de lípidos y al menos una proteína de la envoltura viral, producidos por un procedimiento *in vitro*. Los lípidos se purifican ya sea a partir de huevos o plantas o se producen de manera sintética, y una fracción de lípidos se origina a partir del virus que proporciona la proteína de la envoltura. Prácticamente, los virosomas representan envolturas de virus vacías, reconstituidas, desprovistas de la nucleocápside que incluye el material genético del virus(es) fuente. Los virosomas no son capaces de replicarse pero son vesículas de fusión activas, puras. Virosomas conocidos para usar como portador de antígeno incluyen los virosomas denominados virosomas de la influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIVs). Los IRIVs son vesículas unilamelares esféricas con un diámetro medio de 150 nm y comprenden una doble membrana lipídica, que consiste prácticamente en fosfolípidos, preferentemente fosfatidilcolinas (PC) y fosfatidiletanolaminas (PE). Los IRIVs pueden contener las glicoproteínas de la envoltura viral funcionales HA y NA intercaladas en la membrana bicapa de fosfolípidos. La HA biológicamente activa no solamente confiere estabilidad estructural y homogeneidad a las formulaciones de virosomas sino que además contribuye de manera significativa a las propiedades inmunológicas al mantener la actividad de fusión de un virus.

Aunque estas tecnologías conocidas pueden proporcionar portadores particulados que mejoran las propiedades inmunológicas de un preparado vacunal, las metodologías son típicamente bastante engorrosas y requieren equipo y personal especializado. Adicionalmente, el uso del material viral como portador se evita preferentemente. Adicionalmente, ninguna de las tecnologías existentes se ha informado de que se haya aplicado con éxito en la fabricación de vacunas de subunidades oligoméricas nativas.

Aunque es conocido en la técnica (ver por ejemplo el documento WO 02/101026) presentar un antígeno al sistema inmune por fusión a una secuencia de unión de peptidoglicano y unirla a partículas derivadas a partir de una bacteria Gram-positiva, esta tecnología de portador particulado hasta ahora solamente se describió y aplicó en relación con la presentación de antígenos monoméricos.

El documento WO 99/25836 y Bosma y otros (*Appl. Environ. Microbiol.* 72 [2006], 880-889) enseña que un dominio LysM basta para mediar que el antígeno obtenga la unión a microorganismos Gram-positivos y/o micropartículas de peptidoglicano (BLPs, anteriormente llamados GEMs). Este enfoque fue por ejemplo seguido por Raha y otros (*Appl. Environ. Microbiol.* 68 [2005], 75-81) y Moeini y otros (*Appl. Environ. Microbiol.* 90 [2010], 77-88). Sin embargo, la unión del antígeno solamente a través de un dominio LysM único es un poco limitado (Bosma y otros) y no muy estable, como muestra Raha y otros (Figura 6) quien determinó que aproximadamente 30 a 45% del antígeno unido inicialmente se pierde después de un periodo de almacenamiento de 5 días. En concordancia con esa observación, Moeini y otros muestran en la Figura 6 que aproximadamente 40% del antígeno unido a través de un dominio LysM único se pierde después de un periodo de almacenamiento de 5 días.

La fabricación exitosa de vacunas requiere almacenamiento a largo plazo durante varios meses o incluso a veces durante años. El uso de un dominio de unión LysM único resulta no solamente en rendimientos de unión bajos (Bosma y otros) sino además en una baja estabilidad de los antígenos unidos (Raha y otros, Moeini y otros). Así, este enfoque es inadecuado para un procedimiento de producción de vacunas viable económicamente para vacunas basadas en BLP, que requieren la carga óptima de antígenos a las partículas, es decir altos rendimientos de carga, en conjunto con antígenos que permanecen unidos de forma estable durante un periodo prolongado.

Antes de la presente invención, la opinión generalizada de mejorar la eficacia y la estabilidad de unión al antígeno era aumentar el número de dominios LysM. De hecho, se demostró en la técnica que dominios LysM consecutivos en una única construcción (2 a 3 dominios en línea; en *cis* / intramolecular) proporciona la más óptima y estable unión. Ver la Figura 3 de Bosma y otros, que muestra un marcado aumento en la afinidad de unión por la adición de un segundo dominio LysM, y el nivel fue incluso mayor que el de AcmA silvestre que comprende 3 dominios LysM en *cis*. Sin embargo, los inventores presentes observaron que el enfoque de usar dos (o más) dominios LysM consecutivos en una construcción única no

produce los resultados esperados en el caso de la unión de antígenos oligoméricos. Esto es porque la repetición en tándem de LysM media tal fuerte unión que no solamente los oligómeros funcionales sino además los monómeros no funcionales se unen al portador. La presencia de monómeros no funcionales en las vacunas es altamente indeseable debido a que un complejo tan heterogéneo hace que sea más difícil y engorroso caracterizar vacunas formuladas. Adicionalmente, las repeticiones en tándem de LysM que contienen los monómeros no funcionales compiten fuertemente con los oligómeros funcionales por los sitios de unión disponibles en las BLPs. Con mayor importancia, los monómeros no funcionales en las vacunas pueden imponer un riesgo de salud para el sujeto vacunado ya que se conoce en la técnica que los antígenos incorrectamente plegados, no funcionales, pueden inducir una respuesta inmune perjudicial.

Los inventores por lo tanto tuvieron por objeto proporcionar vacunas de subunidades oligoméricas nativas estables que no solamente tengan mejor inmunogenicidad sino que además se puedan producir en una manera relativamente fácil y económicamente atractiva. Particularmente, era un objetivo aumentar la seguridad y la eficacia de las vacunas (actual) de una manera sencilla y fiable en tanto se evita el uso de materiales de partida patogénicos o inseguros de cualquier otra forma.

Sorprendentemente se encontró que la unión preferencial de oligómeros funcionales se obtiene si los antígenos se fusionan solamente a un dominio LysM único en conjunto con un dominio de oligomerización (OMD) (ver la Figura 2). La combinación de un dominio LysM único fusionado a través de una secuencia enlazadora a un dominio de oligomerización minimiza la presencia en la vacuna de antígenos incorrectamente plegados no funcionales, de ese modo mejora la seguridad de la vacuna. Por otra parte, las vacunas con BLP unida a oligómeros fabricados a partir de antígenos que contienen un dominio LysM único y un OMD mostraron una alta estabilidad tras el almacenamiento prolongado (ver la Figura 5).

Sin desear estar limitado por la teoría, parece que la adición de OMD mejora las características de unión de los dominios LysM únicos, supuestamente a través de interacciones intermoleculares de múltiples moléculas en el oligómero, a un nivel similar al que se logra a través de interacciones intramoleculares para dominios de LysM múltiples en una molécula única. Es de suponer, que cuando se usa un dominio LysM único, en una mezcla de antígenos oligoméricos funcionales y monómeros no funcionales, los oligómeros se unen preferentemente a las BLPs debido a que el dominio LysM único en una configuración de monómero tiene solamente débiles propiedades de unión de BLP. Por otra parte, los dominios LysM únicos de cada molécula individual en una configuración oligomérica se han puesto en una proximidad cercana (en trans) (en virtud de la OMD) tal que se obtiene una unión de alta funcionalidad que es comparable a dos o más dominios LysM en una molécula única. Por lo tanto, la sorprendente idea subyacente de la presente invención es que un dominio LysM único por subunidad cuando se ensambla en una molécula oligomérica por el uso de un OMD permite una unión preferencial del antígeno oligomérico nativo deseado, que no es posible si OMD se omite o se usan dos o más dominios LysM (intramoleculares).

El presente hallazgo permite además la unión selectiva de los oligómeros nativos deseados a partir de una solución de mezcla de oligómeros y monómeros, ya que los monómeros con un dominio LysM único muestran muy pobre unión y los oligómeros con un dominio LysM único unen de manera muy eficaz. Esta unión selectiva de los oligómeros a partir de una solución mezclada de oligo- y monómeros no es posible si se usan dos o más dominios de unión LysM, ya que la unión eficaz es en los casos observados tanto para mono- y oligómeros, o los monómeros incluso unen de manera más eficaz.

A modo de ilustración, con el fin de unir antígenos de subunidades oligoméricas en sus conformaciones nativas a las partículas, los antígenos HA y NA del virus de la influenza y el antígeno F del virus sincitial respiratorio se fusionaron al dominio GCN4 y a través de un enlazador a un dominio de unión de peptidoglicano (Protan) (a partir de N- a C-terminal: HA-GCN4-Protan y Protan-GCN4-NA; F-GCN4-Protan). Las fusiones HA-GCN4-Protan, F-GCN4-Protan y Protan-GCN4-NA producidas en células de riñón embrionario humano (HEK293) rindieron trímeros, trímeros y tetrámeros, respectivamente, que además fueron capaces de unir a dichas partículas portadoras de peptidoglicano (BLPs). Producciones similares se hicieron por medio del uso de células de ovario de hámster chino y células de insectos. La funcionalidad del oligómero HA inmovilizado sobre las partículas se demostró en un ensayo de hemaglutinación realizado con dichas partículas. La inmunogenicidad de dichas partículas cargadas con dicho oligómero de HA se demostró en un modelo de ratón. La inmunogenicidad de las partículas cargadas con el oligómero F se demostró en un modelo de ratón y la eficacia se demostró en un modelo de rata de algodón.

La invención en consecuencia se refiere a un polipéptido recombinante que comprende:

- A) un dominio antigénico N- o C-terminal, que comprende al menos un polipéptido expuesto en la superficie (por ejemplo de origen patogénico o células tumorales) o la parte antigénica de este, el dominio antigénico se fusiona a
- B) un dominio de oligomerización (OMD), dicho dominio de oligomerización se fusiona a través de
- C) un dominio enlazador a
- D) un dominio de unión de peptidoglicano (PBD) consistente de una copia única de un dominio LysM capaz de mediar la unión no covalente del polipéptido a una partícula portadora de peptidoglicano que es una partícula tipo bacteria no

viable (BLP) obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva, y en donde el polipéptido en su conjunto contiene solamente una copia única de un dominio LysM.

Particularmente, la invención proporciona una composición inmunogénica en forma particulada, que comprende:

- 5 i. una partícula tipo bacteria no viable (BLP) obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva como portador particulado;
- ii. oligómeros de un polipéptido producido de manera recombinante unido no covalentemente a dicha BLP, en donde el polipéptido recombinante comprende:
 - 10 A) un dominio antigénico N- o C-terminal, que comprende al menos un polipéptido expuesto en la superficie de origen patogénico o tumoral, o la parte antigénica de este, el dominio antigénico se fusiona a
 - B) un dominio de oligomerización (OMD), dicho dominio de oligomerización se fusiona a través de
 - C) un dominio enlazador a
 - D) un dominio de unión de peptidoglicano (PBD) consistente de una copia única de un dominio LysM que media la unión no covalente del polipéptido a la BLP, y en donde el polipéptido en su conjunto contiene
 - 15 solamente una copia única de un dominio LysM; y
- iii. un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El concepto de invención se basa en el hallazgo inesperado que, para la unión eficaz y selectiva de proteínas de fusión oligoméricas a una partícula portadora, es una ventaja usar un dominio de oligomerización en conjunto con solamente una copia única de un dominio de unión que en la naturaleza es parte de una estructura repetida que comprende múltiples copias del dominio de unión. Por ejemplo, para la unión a partículas de otras entidades de portador, tales como virosomas, liposomas o partículas basadas en polímeros de azúcar, que tienen parejas de unión similares (por ejemplo derivado a partir de enzimas que degradan tales partículas), una proteína de fusión se puede diseñar que comprende un dominio de unión que no se repite en una construcción de oligómero. Ejemplos de otros dominios de unión repetidos a partir del cual se puede usar una copia única para unir a entidades de portador en conjunto con un dominio de oligomerización incluye los siguientes:

- Dominio de unión de colina a partir de por ejemplo autolisinas tales como la enzima LytA neumocócica (por ejemplo, Pfam PF01473) para unir a portadores que contienen colina.
- Dominios de unión de glucano a partir de por ejemplo glicosiltransferasas tales como glucansacarasas de estreptococos orales (por ejemplo, Pfam PF08363) para unir a partículas compuestas de polímeros que contienen glucosa.
- Dominios de unión a lípido fosfatidilinositol, por ejemplo los dominios de homología Pleckstrin (PH) (Pfam PF00169).

35 Dominio Antigénico

La expresión "polipéptido expuesto en la superficie o parte antigénica de este" pretende referirse a cualquier tramo de aminoácidos que se encuentre expuesta en la superficie en su contexto natural, por ejemplo como parte de un patógeno o en una célula tumoral, y que es capaz de montar una respuesta inmune protectora. Las secuencias antigénicas conocidas o aún por descubrir, de origen patogénico o tumoral, se pueden usar en la presente invención. El polipéptido patogénico expuesto en la superficie es por ejemplo de origen viral, bacteriano, o parasítico. En una modalidad preferida, es una proteína viral. Por ejemplo, un polipéptido expuesto en la superficie de origen patogénico comprende un ectodominio de una proteína de virus con envoltura, o una parte antigénica de esta. Los virus con envoltura ilustrativos incluyen el virus de la influenza, coronavirus, coronavirus respiratorio humano, virus de inmunodeficiencia humano (VIH), metapneumovirus, paramixovirus, particularmente el virus respiratorio sincitial (RSV). En un aspecto específico, el polipéptido expuesto en la superficie o la parte antigénica de este se selecciona del grupo que consiste del ectodominio de la hemaglutinina de la influenza o parte de este, ectodominio de la neuraminidasa de la influenza o parte de este, ectodominio de la proteína de las puntas del coronavirus (S) o parte de este, ectodominio de la glicoproteína F de RSV o parte de este, gp140 de VIH o parte de esta y ectodominio de la glicoproteína G o parte de este.

Los antígenos ilustrativos de células tumorales incluyen los receptores tirosina cinasa (RTKs). Las RTKs son receptores de superficie celular de alta afinidad para muchos factores de crecimiento polipeptídicos, citocinas y hormonas. Los receptores de los factores de crecimiento incluyen: receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Los receptores de las hormonas incluyen: receptor de andrógeno y receptor de estrógeno. Un ejemplo de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es la familia de proteínas ErbB de cuatro RTKs estructuralmente relacionadas. Los cuatro miembros de la familia de proteína ErbB son capaces de formar homodímeros, heterodímeros, y posiblemente oligómeros de orden superior tras la activación por un subconjunto de ligandos potenciales del factor de crecimiento. ErbB-1 se sobre expresa en muchos cánceres. La familia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) consiste de PDGF-A, -B, -C y -D, que forman ya sea homo o heterodímeros (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD). Los cuatro PDGFs son inactivos en sus formas monoméricas.

Dominio de unión de peptidoglicano

5 Un polipéptido de la invención se caracteriza por la presencia de solamente una copia única de un dominio LysM (motivo de Lisina) capaz de mediar la unión del polipéptido al peptidoglicano. El dominio LysM, además referido en la técnica como "repetición de LysM", es aproximadamente de 45 residuos de largo. Se encuentra en una variedad de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular bacteriana (Joris y otros, FEMS Microbiol. Lett. 70 [1992], 257-264; Andre y otros, J. Bacteriol. [2008], 7079-7086). El dominio LysM se asume que tiene una función general de unión de peptidoglicano. La estructura de este dominio se conoce (la estructura de un dominio LysM a partir transglicosilasa D lítica de mureína unida a membrana de *E. coli* (MltD). Bateman y Bycroft, J. Mol. Biol. 299 [2000], 1113-1119). La presencia de los dominios LysM no está limitada a las proteínas bacterianas. Están además presente en un número de proteínas eucariotas, mientras que no están presentes en las proteínas arqueas. Una función de unión a la pared celular se postuló para un número de proteínas que contienen dominios LysM. La muramidasa-2 de *Enterococcus hirae*, parcialmente purificada, una proteína similar a AcmA y que contiene seis dominios LysM, se une a fragmentos de peptidoglicano de la misma cepa. La proteína p60 de *Listeria monocytogenes* contiene dos dominios LysM y se demostró que está asociada con la superficie celular. Las mureopeptidasas LytE y LytF de *Bacillus subtilis* tienen tres y cinco repeticiones, respectivamente, en su N-terminal y ambas están unidas a la pared celular.

20 Es importante señalar que los estudios anteriores, por ejemplo el documento WO 99/25836 a nombre del solicitante y Bosma y otros (Appl. Environm. Microbiol. 72 [2006], 880-889) indicaron que un dominio LysM único es muy pobre en la unión a BLPs y que el aumento del número de dominios LysM mejoró la unión a BLPs. Esto está en línea con el hecho de que la mayoría de las proteínas de unión de peptidoglicanos de origen natural contienen múltiples (por ejemplo 2-6) repeticiones en tándem de un dominio LysM. En contraste, se encontró en la presente invención que la unión de antígenos de proteínas oligoméricas nativas a un portador particulado es más eficaz si solamente un dominio LysM único se usa en conjunto con un dominio de oligomerización (OMD), a condición de que una secuencia enlazadora esté presente entre el OMD y el dominio LysM.

30 Una persona con experiencia será capaz de identificar una secuencia de aminoácidos del dominio LysM (Buist y otros, Mol. Microbiol. 68 [2008], 838-847; Visweswaran y otros, Appl. Microbiol. Biotechnol. 92 [2011], 921-928) mediante la realización de una búsqueda basada en homología en bases de datos de secuencias de proteínas públicamente disponibles por medio del uso de métodos conocidos en la técnica. El sitio web PFAM proporciona dos modelos de perfiles ocultos de Markov (perfil HMMs) el cual se puede usar para hacer la búsqueda de la base de datos sensible por medio del uso de descripciones estadísticas de una familia de secuencia consenso. HMMER es un software de libre distribución de implementación de perfil HMM para el análisis de la secuencia de proteína. Como se usa en la presente, el término "dominio LysM" típicamente se refiere a una secuencia de aminoácido que muestra al menos 50%, preferentemente al menos 60%, con la máxima preferencia al menos 70% de similitud de secuencia a la secuencia de acuerdo con el número de acceso PF01476 de PFAM para el dominio LysM (ver <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01476>).

40 Numerosos ensayos de unión descritos en la técnica permiten a la persona con experiencia determinar si un dominio LysM tiene la capacidad necesaria de unir peptidoglicano. Como además se describe en la presente invención más abajo, las células huésped se pueden transfectar con la construcción que se evalúa después de lo cual las células huésped pueden expresar y secretar el polipéptido recombinante de interés en el sobrenadante de cultivo. Las proteínas secretadas después se evalúan para detectar la unión selectiva a la partícula de peptidoglicano obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva (partícula tipo bacteria o BLP) preparada por un procedimiento de tratamiento ácido bien establecido. Por ejemplo, 0.15 mg de BLPs (peso seco) se ponen en contacto con un exceso del sobrenadante aclarado del cultivo de expresión de células huésped de mamífero y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente mientras se mezcla suavemente. Las BLPs con proteína unida después se colectan por centrifugación a baja velocidad. El precipitado se analiza para el polipéptido unido a BLPs por dodecil sulfato sódico-PAGE y transferencia de tipo Western por medio del uso del antisuero adecuado. La cantidad de proteína unida a BLP se puede determinar y cuantificar por dodecil sulfato sódico-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie por medio del uso de por ejemplo BSA purificada como proteína de referencia.

50 Como otro ejemplo, se pueden preparar fusiones con proteína fluorescente (verde) cuyo comportamiento de unión a la superficie de *Lactococcus* se puede evaluar. Ver por ejemplo Hu y otros, Appl. Environ. Microbiol. 8 [2010], 2410-2418.

55 En una modalidad, un polipéptido de la invención contiene solamente una copia única del dominio LysM que se encuentra en la región C-terminal de la principal autolisina AcmA de *L. lactis* que contiene tres dominios LysM homólogos separados por secuencias no homólogas (Protan). La región C-terminal de AcmA se demostró que media la unión de peptidoglicano de la autolisina (Buist y otros, J. Bacteriol. 177 [1995], 1554-1563). Para las secuencias de aminoácidos de los tres dominios LysM de AcmA ver por ejemplo la Figura 2 en el documento WO 99/25836 (en donde los tres dominios LysM están indicados por R1, R2 y R3).

60

Están comprendidas además variaciones dentro de la secuencia exacta de aminoácidos de un dominio LysM de AcmA, bajo la condición de que se mantenga la funcionalidad de unión de peptidoglicano. Así, sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos se pueden realizar sin perder la capacidad de unión de peptidoglicano. Algunas partes de los dominios LysM de AcmA son menos adecuadamente variadas, por ejemplo los motivos conservados GDTL, N y GQ que se encuentran en la mayoría de los dominios LysM. Sin embargo, otros se pueden alterar sin afectar la eficacia del dominio LysM para unir el portador. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos en posiciones que son de naturaleza muy diferente (polar, apolar, hidrófilo, hidrófobo) entre los tres dominios LysM de AcmA se pueden modificar. Preferentemente, el polipéptido de la invención comprende una secuencia que es al menos 70%, preferentemente 80%, con mayor preferencia 90%, como 92%, 95%, 97% o 99%, idéntica a una de los tres dominios LysM de AcmA de *L. lactis*.

El 'porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos' para un polipéptido, tal como 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 por ciento de identidad de secuencia se puede determinar por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia del polipéptido en la ventana de comparación puede incluir adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias de aminoácidos. El porcentaje se calcula: (a) determinar el número de posiciones en las que el aminoácido idéntico ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes; (b) dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación; y (c) multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede llevar a cabo mediante implementaciones computarizadas de algoritmos conocidos, o por inspección. Comparaciones de secuencias y algoritmos de alineación de múltiples secuencias fácilmente disponibles son, respectivamente, los programas de herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) (Altschul y otros, *J. Mol. Biol.* 215 [1990], 403; Altschul y otros, *Nucleic Acid Res.* 25 [1997], 3389-3402) y ClustalW ambos disponibles en internet.

Como otro ejemplo, la secuencia del dominio LysM a partir de endolisina del bacteriófago *Lactobacillus fermentum* (Hu y otros, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 [2010], 2410-2418) o una secuencia que muestre al menos 70% de identidad de secuencia con ella, además, se puede usar en la presente invención.

30 Dominio de oligomerización.

Como se describió anteriormente, un polipéptido de la invención se caracteriza por la presencia de un dominio de oligomerización (OMD) y un dominio LysM único. El OMD es por ejemplo un dominio de dimerización, trimerización o tetramerización. Tales dominios se conocen en la técnica (O'Shea y otros, *Science* 243 [1989], 534-542; Harbury y otros, *Science* 262 [1993], 1401-1407). Por ejemplo, el dominio de oligomerización es un dominio de dimerización, trimerización o tetramerización basado en GCN4. La región del cierre de leucina del activador de la transcripción de levadura GCN4 comprende el dominio de dimerización GCN4-p1 con la secuencia de aminoácido MKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER. Un dominio de trimerización basado en GCN4 (GCN4-pII) preferentemente comprende la secuencia de aminoácido MKQIEDKIEEIESKQKKIENIARIKK.

El término "dominio de tetramerización" como se usa en la presente descripción se define como un dominio que media la formación de un tetrámero de cuatro proteínas monoméricas o partes de estas. Dominios de tetramerización adecuados incluyen, pero sin limitarse a, el dominio de tetramerización de fosfoproteína del virus Sendai y un dominio de tetramerización (GCN4-pLI) derivado por mutación a partir del dominio de dimerización GCN4 de levadura. En una modalidad preferida, la tetramerización de un ectodominio de la neuraminidasa de la influenza recombinante o parte de este se proporciona por un dominio de tetramerización basado en GCN4. Un dominio de tetramerización basado en GCN4 preferentemente comprende la secuencia de aminoácido MKQIEDKLEEILSKLYHIENELARIKKLLGE.

Otros dominios de oligomerización útiles para usar en la presente invención incluyen la secuencia del dominio C-terminal de la fibritina del bacteriófago T4 (foldon) o parte funcional o análoga de esta, particularmente los residuos 27 a 30 C-terminal del foldon (Güthe y otros *J. Mol. Biol.* 337 [2004], 905-915), y el dominio de trimerización soluble de proteína de la matriz de cartílago de pollo (CART). El dominio de oligomerización C-terminal de proteína de la matriz de cartílago de pollo es una espiral enrollada trimérica que comprende tres residuos 43 idénticos (Selvarajah y otros *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 24 [2008], 301-314).

El dominio de oligomerización para usar en la presente invención puede adicionalmente incluir un motivo cisteína doble entre el dominio antigénico y el motivo de espiral enrollada con el fin de estabilizar adicionalmente las proteínas oligoméricas (Louis y otros, *J. Biol. Chem.* 278 [2003], 20278-20286; Magro y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 [2012], 3089-3094).

60 Dominio enlazador

Los ejemplos en la presente invención más abajo ilustran la importancia de un dominio enlazador para el funcionamiento óptimo de OMD y/o el dominio LysM. Por consiguiente, el OMD y LysM están preferentemente separados por un dominio enlazador consistente de entre 10 y 60, preferentemente 20-50, con mayor preferencia 25-40 residuos de aminoácidos. La fusión directa del OMD al dominio LysM rindió resultados desfavorables. Muy buenos resultados se obtuvieron por medio del uso de un dominio enlazador que tiene una longitud de aproximadamente 30 (por ejemplo 28-32) aminoácidos. Ver el Ejemplo 2 para detalles.

En un aspecto, el dominio enlazador comprende una secuencia que se encuentra entre las repeticiones LysM en el C-terminal de AcmA de *L. lactis*. Por ejemplo, L1: GASSAGNTNSGGSTTTITNNNSGTNSSST (29 aminoácidos); L2: GSASSTNSGGSNNSASTPTTTSVTPAKPTSQ (31 aminoácidos) o L3: QSAAASNPSTGSGSTATNNSNSTSSNSNAS (30 aminoácidos). En una modalidad preferida, el dominio enlazador consiste en GASSAGNTNSGGSTTTITNNNSGTNSSST, GSASSTNSGGSNNSASTPTTTSVTPAKPTSQ o QSAAASNPSTGSGSTATNNSNSTSSNSNAS. Además se pueden usar otras secuencias de dominio enlazador de una longitud correcta (es decir, entre aproximadamente 10 y 60 residuos de aminoácidos). La persona con experiencia será capaz de producir y evaluar la idoneidad de una secuencia enlazadora dada basado en los Ejemplos mostrados más abajo y su conocimiento general.

Adicionalmente se encontró que la producción de un polipéptido de la invención se puede mejorar por la presencia de un "dominio de remate" terminal. Por ejemplo, la expresión de una construcción consistente de, a partir de N- a C-terminal, HA fusionada a través de un OMD y una secuencia enlazadora a un dominio LysM único, aumentó tras la adición de un dominio de remate C-terminal (ver la Figura 2A). Por lo tanto, un polipéptido de la invención puede adicionalmente comprender en caso de un dominio antigénico N-terminal un dominio de remate C-terminal, o en caso de un dominio antigénico C-terminal un dominio de remate N-terminal. El dominio de remate puede variar en longitud por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos, preferentemente 20-50, con mayor preferencia 25-40 residuos de aminoácidos, de longitud. Muy buenos resultados se obtuvieron con el dominio de remate que tiene una secuencia idéntica al dominio enlazador que conecta OMD al dominio LysM. En otras palabras, la copia única del dominio LysM en un polipéptido de la invención es favorablemente flanqueada por secuencias de aminoácidos idénticas o al menos altamente (>90%) similares. Por consiguiente, en una modalidad específica el dominio de remate, y preferentemente además el dominio enlazador, consisten de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste de:

GASSAGNTNSGGSTTTITNNNSGTNSSST,
SASSTNSGGSNNSASTPTTTSVTPAKPTSQ y
QSAAASNPSTGSGSTATNNSNSTSSNSNAS.

La orientación relativa de los diversos dominios dentro del polipéptido puede variar, a condición de que una secuencia de dominio enlazador esté siempre situada entre el OMD y el dominio LysM. Dominios enlazadores adecuados se describieron en la presente invención anteriormente.

En una modalidad, el dominio LysM está situado C-terminal a partir del polipéptido de origen patogénico o la parte antigénica de este. Por ejemplo, esta configuración es particularmente adecuada para sustancias que comprenden proteínas de membrana de tipo 1 tales como HA del virus de la influenza, gp140 del VIH, S del coronavirus y F de RSV. En otra modalidad, el dominio LysM está situado N-terminal a partir del polipéptido de origen patogénico o la parte antigénica de este. La última orientación se prefiere para las proteínas de membrana de tipo 2 como NA del virus de la influenza y G de RSV. El polipéptido adicionalmente puede contener una o más secuencias que faciliten la expresión recombinante en y/o la secreción por una célula huésped eucariota. Secuencias ventajosas incluyen secuencias señal N-terminal. Una "secuencia señal" en la presente invención se define como un péptido señal que dirige el transporte de una proteína o parte de esta al retículo endoplásmico de una célula eucariota - el sitio de entrada de la ruta secretora. Una secuencia señal se puede situar N-terminal de la proteína o parte de esta. Los péptidos señal se pueden clivar después de la inserción de la proteína dentro del retículo endoplásmico. Por ejemplo, en una modalidad un vector pMT/BiP para expresión de proteína recombinante en células de *Drosophila* comprende una secuencia señal BiP. En otra modalidad, un vector pCD5 para la expresión de proteína recombinante en células de mamífero comprende la secuencia señal MPMGSLQPLATLYLLGMLVA, por ejemplo la secuencia del péptido señal de la glicoproteína CD5. En aun otra modalidad, la secuencia señal que precede de manera natural la proteína se usa para dirigir el polipéptido precursor a la ruta secretora.

Como se describe anteriormente en la presente invención, un polipéptido recombinante de la invención producido se usa adecuadamente para la fabricación de una composición inmunogénica en forma particulada. Un aspecto adicional de la invención por lo tanto se refiere a una composición inmunogénica en forma particulada, que comprende como portador particulado una partícula de peptidoglicano esférica no viable obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva (partícula GEM o partícula tipo bacteria (BLP)), en donde oligómeros de polipéptidos producidos de manera recombinante se unen no covalentemente a dichas BLP, cada polipéptido se define como anteriormente en la presente invención, y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las BLPs no están vivas, están privadas de proteínas de superficie intactas y contenido intracelular que se puede obtener por tratamiento de células intactas con una solución capaz de eliminar los componentes de pared celular tales como una proteína, ácido teicoico (lipo) o carbohidrato a partir de dicho material de la pared celular sin ruptura mecánica y en donde la gruesa pared celular de peptidoglicano permanece intacta. Las micropartículas de peptidoglicano prácticamente esféricas resultantes reflejan el tamaño y la forma de la bacteria Gram-positiva. Preferentemente, la bacteria es una bacteria no patogénica, con mayor preferencia bacteria de calidad alimentaria. La bacteria se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de un *Lactococcus*, un *Lactobacillus*, un *Bacillus* y un *Mycobacterium* ssp.

Varias modalidades están previstas, por ejemplo el portador particulado se puede proporcionar no covalentemente con al menos un primer oligómero de polipéptidos que comprende polipéptidos expuesto en la superficie o partes antigénicas de estos derivados a partir de un primer patógeno y con un segundo oligómero de polipéptidos que comprende distintos polipéptidos expuestos en la superficie o partes antigénicas derivadas de estos, por ejemplo a partir del mismo o a partir de un segundo, patógeno distinto. Los oligómeros distintos por ejemplo comprenden serotipos HA diferentes, HA y NA, HA y S y/o F de RSV. La proteína F de RSV o un fragmento activo inmunogénico de esta que tiene al menos 10 residuos de aminoácidos es la preferida en términos de mediar la respuesta de anticuerpos protectores contra RSV. La proteína F permanece altamente conservada a través de las dos principales cepas de RSV (subgrupo A y subgrupo B). La proteína F se sintetiza como un precursor de 67 kDa no-fusogénico (F0) que se somete a clivaje proteolítico por furina para producir dos polipéptidos unidos por bisulfuro, F1 y F2. La proteína F entra en la membrana celular a través del N-terminal del polipéptido F 1, mientras que el segmento transmembrana está ubicado cerca del C-terminal. Contiguo a estas dos regiones están dos secuencias de repetición en heptada, indicadas HR-C y HR-N, que forman un trímero estable de estructuras tipo horquilla que se someten a un cambio conformacional para permitir que las membranas celulares y virales estén próximas antes de la entrada viral. En una modalidad preferida el ectodominio de F contiene dos sitios de clivaje mutados lo que resulta en un polipéptido no clivado bloqueado en una conformación prefusión.

En una modalidad preferida, se proporciona una composición inmunogénica en forma particulada, que comprende oligómeros de un polipéptido expuesto en la superficie de origen del virus de la influenza, o partes antigénicas de este, dichos oligómeros están unidos no covalentemente a un portador particulado, y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición inmunogénica de acuerdo con la invención por ejemplo comprende un ectodominio de la hemaglutinina de la influenza trimérico recombinante o parte de este o un ectodominio de la neuraminidasa de la influenza tetramérico recombinante o parte de este. Tal composición inmunogénica es particularmente adecuada para provocar una respuesta inmune en un individuo contra un subtipo o cepa de virus de la influenza, o más de un subtipo o cepa de virus de la influenza relacionados. En algunas modalidades sin embargo, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención comprende una combinación de uno o más ectodominios de la hemaglutinina trimérico o partes de este, y/o uno o más ectodominios de la neuraminidasa tetramérico o partes de este.

Así por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ectodominios de la hemaglutinina trimérico o partes de este se pueden combinar, tales como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y/o H16, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ectodominios de la neuraminidasa tetramérico o partes de este se pueden combinar, tales como N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y/o N9. Además, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede comprender una combinación de uno o más ectodominios de la hemaglutinina trimérico o partes de este y uno o más ectodominios de la neuraminidasa tetramérico o partes de este de diferentes subtipos de influenza. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ectodominios de la hemaglutinina trimérico o partes de este y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ectodominios de la neuraminidasa tetramérico o partes de este se pueden combinar, tales como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y/o N9. Será evidente para una persona con experiencia que el término "uno o más ectodominios" abarca uno o más ectodominios de uno o más subtipos del virus de la influenza, tales como por ejemplo virus A de la influenza y el virus B de la influenza. Así, una composición inmunogénica en forma particulada de acuerdo con la invención puede ser una composición multivalente con la cual se puede lograr una protección mejorada contra una infección por el virus de la influenza en comparación con una composición inmunogénica que comprende un ectodominio de la hemaglutinina de la influenza trimérico recombinante o parte de este o un ectodominio de la neuraminidasa de la influenza tetramérico recombinante o parte de este. Además, o alternativamente, con una composición multivalente se puede lograr una protección más amplia contra más de un tipo de virus de la influenza, o subtipos o cepas de virus de la influenza. Adicionalmente, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención puede ser menos sensible a las alteraciones antigénicas que las tradicionales vacunas de virus de la influenza inactivado o atenuado vivo.

Una modalidad adicional de la invención se refiere a un método para proporcionar una composición inmunogénica en forma particulada, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un polipéptido recombinante de acuerdo con la invención; (b) proporcionar una partícula de peptidoglicano esférica no viable obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva (BLP); (c) permitir la unión no covalente de dicho polipéptido a dicha BLP para formar un complejo inmunogénico que comprende oligómeros de un polipéptido que comprende un polipéptido expuesto en la superficie de origen patogénico o tumoral o la

parte antigénica de este unido no covalentemente a un portador particulado, y (d) formular el complejo inmunogénico en una composición inmunogénica.

5 Como para la etapa (b), medios y métodos para proporcionar micropartículas de peptidoglicano (BLPs) se describen en la técnica. Ver, por ejemplo, el documento WO 02/101026 y US 6,896,887 que describen un método para obtener material de la pared celular de una bacteria Gram-positiva que comprende tratar dicho material de pared celular con una solución capaz de eliminar un componente de la pared celular tal como una proteína, ácido teicoico (lipo) o carbohidrato a partir de dicho material de la pared celular en donde dicho material de la pared celular prácticamente comprende micropartículas de peptidoglicano esféricas. Las partículas así obtenidas simplemente se pueden mezclar con un preparado (por ejemplo un sobrenadante de cultivo celular o polipéptido purificado) que comprende polipéptido(s) producidos de manera recombinante. En virtud de sus dominios LysM y OMD, los polipéptidos se pueden unir a un portador, la unión se puede acompañar, preceder y/o seguir por el ensamblaje en sus configuraciones oligoméricas nativas.

10 Además se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, así como un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico. El término "vector" como se usa en la presente invención se define como una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, bacteriófago o virus animal, capaz de introducir una secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula huésped. Un vector de acuerdo con la invención permite la expresión o producción de una proteína o parte de esta codificada por la secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula huésped. Vectores adecuados en un método de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitarse a, pCD5 (Pouyani y Seed, Cell 20 83 [1995], 333-343) y pCAGGS (Niwa y otros, Gene 108 [1991], 193-199). Una "célula huésped" es una célula que se transformó, o es capaz de transformación, por una molécula de ácido nucleico tal como un vector. El término "transformación" se define en la presente invención como la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula receptora. La transformación de una célula receptora puede resultar en una expresión transitoria de una proteína recombinante por dicha célula, lo que significa que la proteína recombinante se expresa solamente por un período de tiempo definido. Alternativamente, la transformación de una célula receptora puede resultar en la expresión estable, lo que significa que el ácido nucleico se introduce en el genoma de la célula y así pasa a las siguientes generaciones de células. Además, se puede lograr la expresión inducible de una proteína recombinante. Un sistema de expresión inducible requiere la presencia o ausencia de una molécula que permite la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés. Los ejemplos de sistemas de expresión inducibles incluyen, pero sin limitarse a, los sistemas de expresión Tet-On y Tet-Off, sistemas de expresión de genes inducibles por hormonas tales como por ejemplo un sistema de expresión de genes inducible por ecdisona, un sistema de expresión de genes inducible por arabinosa, sistema de expresión inducible por *Drosophila* por medio del uso de un vector pMT/BiP (Invitrogen) que comprende un promotor de metalotioneína inducible.

35 Aún otra modalidad adicional se refiere a una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención. Dicha célula huésped se usa de manera favorable para la producción recombinante de un polipéptido descrito en la presente invención.

40 Un polipéptido recombinante de la invención se expresa, por ejemplo, en una célula procariota, o en una célula eucariota, tal como una célula vegetal, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto. Además, un ectodominio oligomérico recombinante o parte de este de acuerdo con la invención se puede expresar en plantas. Las células procariotas y eucariotas se conocen bien en la técnica. Una célula procariota es por ejemplo *E. coli* o *L. lactis*. Los ejemplos de plantas y/o células vegetales incluyen, pero sin limitarse a, maíz (células), arroz (células), lenteja de agua (células), tabaco (células, tales como las células BY-2 o NT-1), y papa (células). Ejemplos de células de levadura son *Saccharomyces* y *Pichia*. Los ejemplos de células de insectos incluyen, pero sin limitarse a, células de *Spodoptera frugiperda*, tales como las células Tn5, SF-9 y SF-21, y las células de *Drosophila*, tales como las células *Drosophila* Schneider 2 (S2). Los ejemplos de células de mamífero que son adecuadas para expresar una proteína recombinante de acuerdo con la invención incluye, pero sin limitarse a, células de riñón de mono verde africano (Vero), células de riñón de hámster bebé (tal como BHK-21), células de retina humana (por ejemplo las células PerC6), células de riñón embrionario humano (tal como las células HEK293), células Madin Darby de riñón canino (MDCK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de embrión de pollo (las células CEK), células madre embrionarias derivadas de blastodermo (por ejemplo, EB14), fibroblastos de embrión de ratón (tales como las células 3T3), células de ovario de hámster chino (CHO), y mielomas de ratón (tales como NS0 y SP2/0), y derivados de estos tipos de células. En una modalidad preferida se usan las células CHO de mamífero o las células S2 de insectos.

55 Con la presente, la invención además proporciona un método para proporcionar un polipéptido recombinante de acuerdo con la invención, que comprende cultivar una célula huésped descrita anteriormente en un medio adecuado, permitir la expresión del polipéptido y aislar la sustancia. Preferentemente, el método usa una célula huésped eucariota, preferentemente una célula huésped de mamífero, por ejemplo una célula MDCK, HEK, CHO o PerC6, o una célula de insecto, por ejemplo una célula S2.

Adicionalmente, la invención proporciona un método para provocar una respuesta inmune contra un patógeno en un individuo mamífero que comprende administrar a dicho individuo una composición inmunogénica de acuerdo con la invención.

5

La invención proporciona composiciones inmunogénicas que se pueden usar como vacunas. Estas vacunas pueden ser ya sea profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero típicamente serán profilácticas. La invención proporciona un método para levantar una respuesta inmune en un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica de la invención. La respuesta inmune es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos y/o la inmunidad mediada por células. El método puede levantar una respuesta de refuerzo. Preferentemente, el mamífero es un humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un bebé o párvulo) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños además se puede administrar a adultos por ejemplo para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc. Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar tanto niños como adultos. Así un paciente humano puede ser menor de 1 año de edad, menor de 5 años de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son las personas mayores (por ejemplo, >50 años de edad, >60 años de edad, y preferentemente >65 años). Las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos de edad, sin embargo, y se pueden usar de manera más general a una población, que incluye, la juventud (por ejemplo, <5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, de servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, pacientes con enfermedad crónica, o inmunodeficientes.

10

15

20

Por ejemplo, la invención proporciona un método para provocar una respuesta inmune contra una enfermedad viral en un individuo, preferentemente en donde la causa de la enfermedad viral es el virus de la influenza, coronavirus animal, coronavirus respiratorio humano, virus de inmunodeficiencia humano (VIH), o paramixovirus, particularmente el virus sincitial respiratorio (RSV) o el metapneumovirus. El método implica administrar a dicho individuo una vacuna de subunidad oligomérica nativa de la invención que comprende un:

25

30

35

A) un dominio antigénico N- o C-terminal, que comprende al menos un polipéptido expuesto en la superficie de origen patogénico o la parte antigénica de este, seleccionado a partir del grupo que consiste del ectodominio de la hemaglutinina (HA) de la influenza o parte de este, el ectodominio de la neuraminidasa (NA) de la influenza o parte de este, el ectodominio de la proteína (S) de la punta del coronavirus o parte de este, ectodominios de la glicoproteína F o G de RSV o parte de este y el ectodominio de la gp140 del VIH o parte de este, el dominio antigénico se fusiona a

B) un dominio de oligomerización (OMD), dicho dominio de oligomerización se fusiona a través de

C) un dominio enlazador a

D) un dominio de unión de peptidoglicano (PBD) consistente de una copia única de un dominio LysM capaz de mediar la unión no covalente del polipéptido a una partícula tipo bacteria no viable (BLP) obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva, y en donde el polipéptido en su conjunto contiene solamente una copia única de un dominio LysM.

40

45

La composición de acuerdo con la invención se puede administrar por cualquier forma conocida por la persona con experiencia en la técnica, con preferencias por las rutas de administración nasal, sublingual, oral o parenteral. En una modalidad preferida, la ruta de administración es la ruta nasal. La invención además proporciona un dispositivo de administración pre-llenado con una composición inmunogénica de la invención. Dispositivos de administración adecuados incluye contenedores y jeringas (aerosol) pre-llenados. Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede llevar a cabo por inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido), o por vía de la mucosa, tal como rectal, sublingual, oral (por ejemplo, tableta, aerosol), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración en la mucosa. La administración intramuscular es típica, como se discutió anteriormente.

50

La invención se puede usar para provocar inmunogenicidad sistémica y/o de la mucosa, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o de la mucosa aumentada.

55

La dosificación puede ser por un esquema de dosis única o un esquema de múltiples dosis. Las múltiples dosis se pueden usar en un esquema de inmunización primario y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. En un esquema de múltiples dosis las diversas dosis se pueden administrar por la misma o diferentes rutas por ejemplo, una primera parenteral y la intensificadora por la mucosa, una primera por la mucosa y la intensificadora parenteral, etc. Las múltiples dosis típicamente se administrarán al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10

semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). Las composiciones inmunogénicas de la invención se puede administrar al mismo paciente cada año, cada 2 años, cada 3 años, etc.

Además se prevé la co-administración de diferentes vacunas respiratorias a un sujeto al mismo tiempo por ejemplo, administrar una vacuna neumocócica al mismo tiempo que una vacuna de la influenza. Vacunas de combinación, en la que dos o más vacunas se administran como una mezcla, como sacáridos neumocócicos combinados (conjugados o no conjugados) con un antígeno del virus sincitial respiratorio (RSV), y además se especula que podría añadirse un número de otros antígenos tal como un antígeno del virus de la influenza. Por ejemplo, la presente invención se puede aplicar para la fabricación de una vacuna de combinación que comprende una combinación de la proteína de fusión (F), el adjunto (G) y las proteínas de la matriz (M) de RSV con una vacuna de la influenza.

La invención se refiere además al uso de una composición vacunal o de un método para la preparación de una composición vacunal, como se describió anteriormente, para inmunizar mamíferos contra el antígeno conformacional natural, particularmente contra la influenza o infección por RSV, o para producir anticuerpos dirigidos contra el antígeno conformacional, tal como el antígeno HA, NA o RSV. En un aspecto, la invención proporciona el uso de un polipéptido recombinante de acuerdo con la invención para la preparación de una vacuna o composición inmunogénica destinada a prevenir o tratar la influenza o infección por RSV.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Representación esquemática (paneles A y B) y unión a BLPs (paneles C y D), y estado de multimerización (E) de varias proteínas de fusión HA. Representación esquemática de HA-OMD-Protan lineal (panel A) que es capaz de formar trímeros (abreviado como HA-P^{tri}) y HA-Protan (panel B) que existe como un monómero (abreviado como HA-P^{mon}). El OMD es el GCN4-pII. La parte Protan (=PBD) de la fusión varía en tamaño. El número a continuación de la letra P en el nombre de la fusión de proteína abreviado indica el número de dominios de LysM en la parte Protan. L1-2: secuencias enlazadoras. La L a continuación del número en el nombre de la fusión de proteína abreviado indica la presencia de un dominio enlazador C-terminal después del dominio LysM más C-terminal. LysM1-2: Dominios LysM (unión de péptidoglicano). Los paneles C y D muestran que se requiere solamente 1 dominio LysM para la unión eficaz a BLPs cuando las proteínas de fusión HA-Protan contienen un dominio GCN4 (OMD). Tres variantes diferentes de proteínas de fusión HA-Protan sin motivos de trimerización GCN4 y una tal proteína de fusión que contiene un motivo GCN4 se expresaron en células HEK293S (GNTI). Esto se hizo para proteínas HA originadas a partir de H1M (panel C) y a partir de X31 (panel D) en duplicado. Se dejó que las proteínas de fusión HA-Protan obtenidas se unieran a BLPs por la incubación de 150 µg (peso seco) de las partículas con una cantidad en exceso de aproximadamente 30-45 µg de las proteínas de fusión después de lo cual las partículas se recogieron. Después 50 µg de cada fracción BLP se analizó por SDS-PAGE y tinción por Azul de Coomassie [paneles I]. Como un control la expresión se verificó por el análisis de muestras a partir del medio cultivo celular por SDS-PAGE y Transferencia de tipo Western [paneles II] por medio del uso del AcM PA90 (α-Protan). Todas las proteínas de fusión se expresaron bien. En conjunto, estos experimentos muestran que un dominio LysM único combinado con un OMD es suficiente para la unión eficaz de proteínas a BLPs mientras que se requieren dos dominios LysM para la unión eficaz cuando ningún OMD está presente. Panel E: Las proteínas de fusión HA-Protan que contienen OMD son predominantemente oligoméricas. Análisis de diferentes variantes de HA-GCN4-Protan por electroforesis en gel nativo azul seguido por transferencia de tipo Western por medio del uso del anticuerpo Protan α-PA90. Para cada variante, cantidades iguales de los sobrenadantes de cultivo celular aclarados se hirvieron por 10 segundos (10"), 30 segundos (30") o 3 minutos (3') antes de la aplicación al gel. Las proteínas de fusión HA-Protan analizadas fueron las proteínas HA-P1^{tri} y HA-P1L^{tri} derivadas del virus H1M. Todas estas proteínas HA migraron con la movilidad correspondiente a la de un trímero después del calentamiento muy breve (10 seg), pero se disociaron en las formas dimerica y monomérica de HA después de tiempos de ebullición más largos. Los trímeros HA-P1^{tri} y HA-P1L^{tri} permanecieron detectables aun después de la ebullición prolongada de las muestras. Todas las variantes HA-P^{mon} equivalentes migraron con la movilidad de un monómero. Adicionalmente, la mayoría de estas proteínas HA-P^{mon} exhibieron una tendencia variable, pero a veces fuerte a formar agregados de alto peso molecular (indicados por los asteriscos), probablemente como un resultado del pobre plegado y estabilidad de estas proteínas no nativas.

Figura 2. Representación esquemática de las variantes HA-P2L^{tri} y HA-P1L^{tri} y la unión de estas a BLPs para la producción de vacunas. Panel A: la producción de HA-P2L^{tri} y HA-P1L^{tri} resulta principalmente en variantes triméricas pero además se producen bajas cantidades de las variantes monoméricas no deseadas, incorrectamente plegadas. Panel B: la unión de las variantes mono- y trimérica HA-P2L^{tri} a BLPs seguida por el subsecuente lavado resulta en vacunas BLP con HA oligomérica nativa unida y HA monomérica no deseada e incorrectamente plegada. La unión de las variantes mono- y trimérica HA-P1L^{tri} a BLPs seguida por el subsecuente lavado resulta en vacunas BLP con HA oligomérica nativa unida y sin HA monomérica no deseada y incorrectamente plegada. Por lo tanto, la unión de proteínas a BLPs por medio del uso de un dominio LysM único combinado con un OMD tal como GCN4 permite la unión selectiva de las proteínas oligoméricas activas biológicas nativas deseadas.

Figura 3. Cantidad de las variantes de HA-Protan con y sin OMD unidas a BLPs. Se dejó que cantidades crecientes (0 - 4 µg) de HA-P1L^{tri} (H1-GCN4-P1L) y HA-P2L^{mon} (H1-P2L) se unieran a una cantidad fija (0.3 mg) de BLPs. Después de la unión se determinó la cantidad de HA unida. El experimento se realizó en duplicado. Claramente, más HA-P1L^{tri} se une a BLPs a concentraciones similares a las usadas para HA-P2L^{mon}. Por lo tanto, la unión de proteínas a BLPs por medio del uso de un dominio LysM único combinado con un OMD tal como GCN4 es más eficaz que con dos dominios LysM sin un OMD.

Figura 4. La HA oligomérica (en contraste con la HA monomérica) unida a BLPs es biológicamente funcional en una prueba de aglutinación. A. Representación esquemática de un ensayo de hemaglutinación. Panel 1: Virus de la influenza mezclado con glóbulos rojos (RBCs; eri) son capaces de unirse a RBCs y son capaces de formar redes que causan aglutinación. Panel 2: Trímeros HA unidos a BLPs (BLP-HA^{tri}) y mezclados con RBCs son capaces de unirse a RBCs, y son capaces de formar redes que causan aglutinación. Panel 3: Monómeros HA unidos a BLPs (BLP-HA^{mon}) y mezclados con RBCs no son capaces de unirse a RBCs, y no son capaces de formar redes que causan aglutinación; el sedimento de RBCs en los pozos de una placa de microtitulación, que es visible como un punto. Panel 4: BLPs mezcladas con RBCs no son capaces de unirse a RBCs y no causan aglutinación. Panel 5: Los trímeros HA (HA^{tri}) se unen a RBCs, pero no son capaces de formar redes que causan aglutinación.

B. Ensayo de hemaglutinación por medio del uso de RBCs de pavo. La HA usada en las fusiones es H1M. Línea 1: control negativo, RBCs + amortiguador. Línea 2: RBCs + BLP. Línea 3: RBCs + BLP con 4 µg HA-P1L^{tri} unida. Línea 4: RBCs + BLP con 2 µg HA-P1L^{tri} unida. Línea 5: RBCs + BLP con 1 µg HA-P1L^{tri} unida. Línea 6: RBCs + BLP con 0.5 µg HA-P1L^{tri} unida. Línea 7: RBCs + 4 µg HA-P1L^{tri}. Línea 8: RBCs + BLP con 4 µg HA-P2L^{mon} unida. Línea 9: RBCs + BLP con 2 µg HA-P2L^{mon} unida. Línea 10: RBCs + BLP con 1 µg HA-P2L^{mon} unida. Línea 11: RBCs + BLP con 0.5 µg HA-P2L^{mon} unida. Línea 12: RBCs + 4 µg HA-P2L^{mon}. Este experimento muestra claramente que solamente la HA oligomérica unida a BLPs (BLP-HA^{tri}) es biológicamente funcional, mientras que la HA monomérica unida a BLPs (BLP-HA^{mon}) no lo es.

Figura 5. Estabilidad de HA-P1L^{tri} unida a BLPs. Panel A: HA-P1L^{tri} unida a BLPs (relación 3.3 µg HA-P1L^{tri} unida a 1 mg BLPs) se alicuotó y almacenó a 2-8 °C. A T=0, 3, 6 y 9 meses posteriores a la formulación se probó una alicuota para la cantidad de HA-P1L^{tri} unida a BLPs (cantidad medida a T=0 establecida al 100%); y panel B: actividad biológica en una prueba de aglutinación. AU; unidades de aglutinación. Este experimento muestra claramente que HA-P1L^{tri} unida a BLPs es completamente estable y biológicamente funcional hasta al menos 9 meses de almacenamiento en PBS a 2-8 °C.

Figura 6. La cantidad promedio de anticuerpos anti-H1M IgG en µg/ml (panel A); títulos HI (panel B) presentes en el suero; y S-IgA (panel C) presente en el lavado nasal de ratones inmunizados tres veces intranasalmente con: (i) HA trimérica soluble (HA^{tri}) [0.33 µg por dosis]; (ii) HA trimérica soluble mezclada con BLP (BLP+ HA^{tri}) [0.33 µg HA^{tri} y 0.1 mg BLP por dosis]; (iii) HA trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-HA^{tri}) [0.33 µg HA^{tri} y 0.1 mg BLP por dosis], y (iv) HA monomérica (HA-P1L^{mon}) unida a BLPs (BLP-HA^{mon}) [0.33 µg HA^{tri} y 0.1 mg BLP por dosis]. Claramente, la formulación particulada BLP-HA^{tri} fue la formulación más inmunogénica en comparación con la HA trimérica soluble (HA^{tri}) y la HA trimérica soluble mezclada con BLP (BLP+ HA^{tri}). Con respecto a los ensayos funcionales de anticuerpos (títulos HI; panel B y S-IgA; panel C) la formulación particulada oligomérica BLP-HA^{tri} provocó respuestas más altas que la formulación particulada monomérica BLP-HA^{mon} lo que muestra que la HA^{tri} biológicamente funcional es la conformación más inmunogénica.

Figura 7. Características de expresión y unión a BLP de HA^{tri}-Protan, proteínas de fusión que contienen GCN4 (OMD) con varios restos de Protan. Panel A: Las células HEK 293 se transfectaron con los respectivos plásmidos de expresión y se incubaron después de lo cual los sobrenadantes de cultivo se cosecharon y se lisaron las células. Las muestras de cada una se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western, por medio del uso de un anticuerpos dirigido contra el resto de Protan (α-PA90). Se muestra la producción de una serie de proteínas HA que contienen GCN4 (designadas HA-P^{tri} para indicar su potencial de trimerización) de los subtipos H3 (X31) y H1 (H1M). Todas las variantes HA-P^{tri} se expresaron fácilmente y se secretaron eficazmente al medio de cultivo celular según se juzgó por su limitada presencia en los lisados celulares. Las proteínas de fusión X31 HA-P^{tri} se produjeron algo menos abundantes que las proteínas de fusión H1M HA-P^{tri}, mientras en general las proteínas HA fusionadas a P1L y P2L parecen mostrar los más altos niveles de producción con la retención en las células más limitada. Panel B: diferentes proteínas de fusión HA-Protan que contienen GCN4 se compararon por su unión a BLPs por la incubación de cantidades iguales de las partículas en presencia de cantidades en exceso de proteínas de fusión y el análisis de las cantidades de proteínas unidas a BLP por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western. Se encontró que todas las variantes HA-P^{tri} se unían pero con eficacias marcadamente variables. Para las proteínas HA derivadas de ambos virus H1M y X31, las variantes HA-P1^{tri}, HA-P1L^{tri} y HA-P2L^{tri} se unieron a BLPs más eficazmente. Se observó una baja eficacia de unión para las proteínas H1M1 y X31 HA-P2^{tri} a BLPs. Este resultado indica que 1 dominio LysM en combinación con un OMD es suficiente para permitir una excelente unión a BLPs. Panel C: Transferencia de tipo Western incubada con anti-HA (anti-H1M). Línea 1: proteínas marcadoras, tamaños indicados en el margen en kDa. Línea 2: partículas BLP, 30 µg. Línea 3: HA^{tri}, que porta una etiqueta Strep (HA-Strep^{tri}) en lugar de una extensión Protan (40 ng). Línea 4: BLPs (30 µg) recuperados a partir de una incubación con HA-Strep^{tri} (840 ng). Línea 5:

HA-P1L^{tri}, 44 ng. Línea 6: BLPs (30 µg) recuperados a partir de una incubación con HA-^{tri} (880 ng). En conjunto estos experimentos muestran que las proteínas de fusión se expresan bien y se secretan de las células de mamíferos y que la presencia del dominio bacteriano Protan en el C-terminal no interfiere con la secreción eficaz de las proteínas de fusión oligoméricas HA (panel A). Además, este experimento muestra claramente que 1 dominio LysM es suficiente para obtener una excelente unión a BLPs y que el dominio GCN4, mientras se requiere para mejorar la unión de un dominio LysM único, no se une a BLPs (panel C).

Figura 8. Representación esquemática (A), expresión (B), estado de multimerización (C) y unión a BLPs (D) de Protan-NA. Panel A: Representación esquemática de Protan-OMD-NA lineal que es capaz de formar tetrámeros (abreviado como P-NA^{tet}) y Protan-NA que existe como un monómero (abreviado como P-NA^{mon}). El OMD es el GCN4-pLI en las construcciones NA. La parte Protan (=PBD) de la fusión contiene 1 dominio LysM con o sin enlazador. La L a continuación del número en el nombre de la fusión de proteína abreviado indica la presencia de un dominio enlazador C-terminal después del dominio LysM. Panel B: muestra la expresión de proteínas de fusión Protan-NA con o sin el motivo de tetramerización GCN4. Las células HEK 293 se transfectaron con los respectivos plásmidos de expresión y se incubaron después de lo cual los sobrenadantes de cultivo se cosecharon y se lisaron las células. Las muestras de cada una se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western, por medio del uso de un anticuerpos dirigido contra el resto de Protan (α-PA90). Similar a las proteínas HA-Protan, se encontró que todas las variantes de Protan-NA se secretaron al sobrenadante de cultivo; se observó una retención intracelular menor para las variantes de Protan-NA que contienen motivo de tetramerización GCN4. Panel C: muestra que las proteínas de fusión NA-Protan que contienen OMD son oligoméricas. Aquí se comparó el estado oligomérico de las variantes de P1L-NA con (+) y sin (-) GCN4. Muestras de estas variantes de P1L-NA se analizaron por electroforesis en gel nativa azul. La mayor parte de la proteína P1L-NA^{mon} migró como un monómero y parte de esta como un dímero. Sin embargo, no se pudo detectar ningún tetramero. En contraste, la proteína P1L-NA^{tet} migró de acuerdo con un tetrámero sin detección de monómeros o dímeros. En conjunto estos experimentos muestran que las proteínas de fusión NA se expresan y secretan bien a partir de las células de mamíferos y que la presencia del dominio bacteriano Protan en el N-terminal no interfiere con la secreción eficaz de las proteínas de fusión oligoméricas NA (como se observó para las proteínas de fusión oligoméricas HA con Protan en el C-terminal). Además, el motivo GCN4 induce y estabiliza el estado oligomérico en la proteína de fusión NA como se observó para la proteína de fusión HA. Panel D: se analizaron diferentes proteínas de fusión NA-Protan por sus características de unión a BLPs. Se dejó que las variantes de Protan P1 con o sin enlazador C-terminal del dominio LysM y con y sin OMD (GCN4) se unieran a BLPs por la incubación de 150 µg (peso seco) de las partículas con una cantidad en exceso de aproximadamente 30-45 µg de las proteínas de fusión después de lo cual las partículas se recogieron (líneas indicadas con B). Las líneas indicadas con S muestran la NA que permaneció en el medio después de la unión. Una incubación simulada de BLPs con amortiguador se tomó a todo lo largo como control negativo. Después 5 µg de la fracción BLP se analizó por SDS-PAGE y análisis de tipo Western por medio del uso de suero de conejo anti-PA90 (anti-Protan). Ninguna o una unión pobre se obtuvo para las proteínas de fusión P1L-NA^{mon} y P1-NA^{mon} que carecen de un motivo de tetramerización GCN4 como se observó para las construcciones HA-P1^{mon}. Sin embargo, se observó una unión claramente eficaz a BLP con la proteína de fusión P1L-NA^{tet}. En contraste, la construcción P1-NA^{tet} que carece de un enlazador entre el dominio LysM y el dominio OMD, mostró una unión pobre. Claramente, un motivo LysM único ya es suficiente para la unión eficaz de las formas oligoméricas de Protan, siempre que esté presente un dominio enlazador entre el dominio LysM y el OMD.

Figura 9. Actividad neuraminidasa de las variantes NA. Las variantes de neuraminidasa P1 y P1L - tanto sin y con GCN4 - se probaron por su actividad neuraminidasa por medio del uso de un ensayo de actividad neuraminidasa basado en fetuina. Placas de 96p Nunc MaxiSorp se recubrieron durante la noche a 4 °C con 100 µl de 5-µg/ml fetuina. Cien microlitros de muestras de medio de cultivo celular que contenían cantidades similares de NA (según se confirmó por transferencia de tipo Western) se diluyeron en serie y se añadieron a los pozos recubiertos con fetuina. Después de 1 h de incubación a 37 °C, las placas se lavaron y la actividad neuraminidasa se midió subsecuentemente por la adición de aglutinina de cacahuate marcada con peroxidasa (2.5 µg/ml; Sigma), incubación por 1 h a temperatura ambiente, lavado de las placas, y adición de 100 µl de sustrato de peroxidasa (TMB) a cada pozo. Después de 5 min, se detuvo la reacción por la adición de 100 µl de 0.3 M ácido fosfórico, y los valores de DO se midieron a 450 nm por medio del uso de un lector de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (EL-808 [BioTEK]). Como se muestra por el gráfico, las proteínas Protan-NA^{tet} que contienen el motivo de tetramerización GCN4 exhibieron una actividad sialidasa dependiente de la concentración. No se encontró actividad sialidasa para las proteínas de fusión Protan-NA que carecían del motivo de tetramerización GCN4. Estos resultados demostraron claramente que las formas oligoméricas de Protan-NA son enzimáticamente funcionales.

Figura 10. Representación esquemática (A y B) y expresión y unión a BLPs (C) de varias proteínas de fusión F. Representación esquemática de F-OMD-Protan lineal (panel A) que es capaz de formar trímeros (abreviado como F-P^{tri}) y F-Protan (panel B) que existe como un monómero (abreviado como F-P^{mon}). El OMD es la secuencia GCN4-pII en las construcciones F. La parte Protan (=PBD) de la fusión varía en tamaño. El número a continuación de la letra P en el nombre de la fusión de proteína abreviado indica el número de dominios de LysM en la parte Protan. L1-13: secuencias enlazadoras. La L a continuación del número en el nombre de la fusión de proteína abreviado indica la presencia de un dominio enlazador

C-terminal después del dominio LysM más C-terminal. LysM1-2: Dominios LysM (unión de péptidoglicano). En el panel C diferentes proteínas de fusión F-Protan que contienen GCN4 se compararon por su unión a BLPs por la incubación de cantidades iguales de las partículas en presencia de cantidades en exceso de proteínas de fusión y el análisis de las cantidades de proteínas unidas a BLP por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western. Se encontró que la variante F-P^{tri} con un dominio LysM y GCN4 y la variante F-P^{mon} con dos dominios LysM se unieron eficazmente a BLPs. Se observó baja eficacia de unión a BLPs para la variante F-P^{mon} con un dominio LysM pero que carece de GCN4. Este resultado indica que 1 dominio LysM en combinación con un OMD es suficiente para permitir la unión excelente de proteínas F a BLPs, similar a lo que se observa para HA y NA. Para estudiar la expresión de las proteínas de fusión Protan-F, células HEK 293 se transfectaron con los respectivos plásmidos de expresión y se incubaron después de lo cual los sobrenadantes de cultivo se cosecharon y se lisaron las células. Las muestras de cada una se analizaron por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western, por medio del uso de un anticuerpos dirigido contra el resto de Protan (α -PA90). Similar a las proteínas HA-Protan y Protan-NA, se encontró que todas las variantes de F-Protan se secretaron al sobrenadante de cultivo celular.

Figura 11. La proteína F trimérica unida a BLPs (BLP-F^{tri}) induce respuestas de anticuerpos tipo Synagis[®] en ratones después de la administración intranasal. Panel A; representación esquemática del ELISA de competencia de Synagis[®]. Los pozos de las placas de microtitulación se recubrieron con proteína F. Estos pozos se incubaron con diluciones seriadas dos veces de suero de ratones vacunados. Después de la incubación las diluciones del suero se eliminaron por lavado y los pozos subsecuentemente se incubaron con cantidades no-saturantes de Synagis[®]. Después de la incubación, el Synagis[®] que no se unió se transfirió a una segunda placa y, después de la unión, se detectó por medio del uso de un anticuerpo secundario. La cantidad del Synagis[®] unido detectado es una medida de la cantidad de anticuerpos tipo Synagis[®] en el suero de los ratones vacunados. Panel B: resultado del ELISA de competencia, que muestra claramente que anticuerpos tipo Synagis[®] se provocan en el suero de los ratones vacunados intranasalmente con BLP-F^{tri}.

Figura 12. Eficacia (panel A), serología (panel B) y seguridad (panel C) después de la vacunación intranasal de ratas algodón con BLP-F^{tri}. Las ratas algodón se inmunizaron tres veces intranasalmente con un intervalo de 14 días con: (i) F soluble (F^{mon}) [4 μ g por dosis]; y (ii) F trimérica (F-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-F^{tri}) [4 μ g HA^{tri} y 0.5 mg BLP por dosis], y (iii) PBS como un control negativo. RSV inactivado con formalina en complejo con sales de aluminio (FI-RSV) intramuscular se administró como un control de la enfermedad aumentada. En el día 14 después de la vacunación todos los animales se retaron (i.n.) con RSV/a/largo. Se extrajo la sangre de los animales para los títulos de neutralización de virus (VN) en los días 0, 28 y 42. En el día 5 posterior al reto los animales se mataron y se extrajeron los pulmones *en bloque* y se biseccionaron para titulación viral e histopatología para calificar la mejora en las características de la enfermedad. El Panel A muestra una reducción significativa en el título de virus después de la vacunación con BLP-F^{tri} en comparación con la vacunación con F^{mon} o PBS. El título de virus bajo coincide con el mayor nivel de títulos de VN en los días 28 y 42 (Panel B). Claramente, la formulación BLP-F^{tri} particulada fue la formulación más inmunogénica y protectora en comparación con la F soluble (F^{mon}) y el PBS. Panel C: las secciones de histopatología de los pulmones de las ratas algodón vacunada se calificaron para neumonía intersticial y alveolitis. La vacunación con BLP-F^{tri} seguida de la infección con RSV resultó solamente en una calificación de histopatología del pulmón baja en comparación a las calificaciones observadas después de la vacunación con FI-RSV y el subsecuente reto con RSV. Claramente, la formulación particulada BLP-F^{tri} no induce enfermedad aumentada en ratas algodón.

Sección experimental

Materiales y Métodos

1.1. Genes y vectores de expresión

Los genes optimizados de codón humano que codifican el ectodominio de la hemaglutinina (HA) (a.a. 17-522) de los virus de la influenza A/Aichi/2/68 H3N2 (X31) y A/California/04/2009 H1N1 (H1M), el dominio principal de la neuraminidasa (NA) (a.a. 75-469) de A/Mallard/Países Bajos/2/2005 H5N2 (*ID de taxonomía*: 571469), y el ectodominio de la proteína de fusión (F) del virus sincitial respiratorio (RSV) subtipo A, GA7SA99VR360 aislado (a.a. 26-513) se sintetizaron (GenScript) y clonaron en el vector pCD5 - un derivado del plásmido de expresión S1-Ig (Li y otros, Nature 426 [2003], 450-454) - para la expresión en las células HEK293T.

El gen HA se flanqueó por secuencias que codifican N-terminalmente una secuencia señal CD5 y C-terminalmente la secuencia de trimerización artificial GCN4 (GCN4-pII) (Harbury y otros, Science 262 [1993], 1401-1407) seguido por una de cuatro variantes del dominio Protan (Figura 1A). Tres de estas construcciones probaron expresarse y unirse bien a BLPs y para estas variantes se construyó además una construcción que carecía de la secuencia de trimerización (Figura 1B). El gen NA se flanqueó por secuencias que codifican una secuencia señal CD5 N-terminal CD5 seguida por el dominio Protan P1 o P1L y una secuencia de tetramerización artificial GCN4 (GCN4-pLI) (Harbury y otros, Science 262 [1993], 1401-1407) (Figura 8A). Basado en estas construcciones, se generaron dos construcciones adicionales que carecen de la secuencia de

tetramerización artificial GCN4 (Figura 8A). El gen F se flanqueó por las secuencias que codifican N-terminalmente una secuencia señal CD5 y C-terminalmente la secuencia de trimerización artificial GCN4 (GCN4-pII) (Harbury y otros, Science 262 [1993], 1401-1407) seguido por un dominio Protan (Figura 10A). Se construyeron además dos construcciones que carecen de una secuencia de trimerización seguida por uno o dos dominios Protan (Figura 10B).

5

1.2 Expresión de proteína y unión a BLPs

Las células HEK293T se transfectaron con los vectores de expresión pCD5 que contienen las secuencias de codificación de HA, F o NA por medio del uso de polietilenimina (PEI) en una relación 1:5 ($\mu\text{g ADN} : \mu\text{g PEI}$). A las 6 h después de la transfección el medio de transfección se reemplazó por medio de expresión 293 SFM II (Invitrogen), suplementado con bicarbonato de sodio (3.7 g/litro), glucosa (2.0 g/litro), Primatone RL-UF (3.0 g/litro, Kerry Bio-Science, Zwijndrecht, Países Bajos), penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$), glutaMAX (Gibco), y 1.5% DMSO. Los sobrenadantes del cultivo de tejido se cosecharon 5-6 días después de la transfección. La expresión de las proteínas HA-Protan y Protan-NA se confirmó por transferencia de tipo Western por medio del uso del anti-suero de conejo policlonal específico por Protan (LysM) α -PA90 como un anticuerpo primario, uno de cerdo- α -conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Dako) como anticuerpo secundario y detección por medio del uso de ECLTM (AmershamTM, GE Healthcare).

Las proteínas HA-Protan, F-Protan o Protan-NA secretadas se unieron selectivamente a BLPs por la adición de 0.15 mg BLPs (peso seco) a un exceso de sobrenadante de cultivo de expresión de HEK293T aclarado y la incubación por 30 minutos a temperatura ambiente mientras se mezclaban suavemente. Las BLPs con la proteína unida se recogieron por centrifugación a baja velocidad y el precipitado se lavó tres veces con DPBS. Finalmente el precipitado se resuspendió en un volumen de DPBS igual al volumen original de BLPs añadido. La unión de las proteínas de fusión HA, F y NA a los BLPs se evaluó por SDS-PAGE y transferencia de tipo Western por medio del uso del antisuero α -PA90, mientras que la cantidad de proteína unida a BLP se determinó por SDS-PAGE y subsecuente tinción por azul de Coomassie por medio del uso de BSA purificada como proteína de referencia.

El estado oligomérico de las proteínas de fusión se determinó por electroforesis en geles nativos azules y subsecuente transferencia de tipo Western por medio del uso de α -PA90.

1.3 Caracterización biológica de las proteínas de fusión recombinantes HA-Protan y Protan- NA.

La actividad biológica de HA unida a BLP se evaluó por ensayo de hemaglutinación por medio del uso de eritrocitos de pollo o pavo. Solamente con proteína trimérica funcional HA unida a su superficie, las BLPs mediarán la formación de una red ('malla') de eritrocitos reticulados, un proceso conocido como aglutinación. La HA trimérica o BLP solas no reticularán los eritrocitos. En el ensayo, 25 μl de HA-Protan, HA unida a BLP o BLPs solubles se diluyeron en serie en 25 μl DPBS + 1% BSA en una de 96 pozos (con forma de V CellStar[®], Greiner Bio-One). De la última dilución se desecharon 25 μl con el objetivo de obtener iguales volúmenes en todos los pozos. A todos los pozos se añadió un volumen igual de eritrocitos de pollo 0.5%, las suspensiones se mezclaron suavemente y se incubaron por 45 minutos a 4 °C para permitir la reticulación y/o precipitación de los eritrocitos.

40

La funcionalidad de las proteínas de fusión Protan- NA solubles se evaluó por medio del uso de un ensayo de fetuina en fase sólida (Lambre y otros Clin. Chim. Acta [1991] 198:183-193). Placas de 96 pozos Nunc MaxiSorp se recubrieron durante la noche a 4 °C con 100 μl de 1 $\mu\text{g/ml}$ fetuina. Los sobrenadantes de cultivo de expresión HEK293T aclarados que contenían cantidades similares de proteínas de fusión Protan-NA (basado en las cantidades de Protan según se determinaron por transferencia de tipo Western) se diluyeron seriadamente en PBS-Ca/Mg [0.901 mM/0.493 mM] después de lo cual se añadieron 100 μl de la mezcla a los pozos recubiertos con fetuina. Después de 1 h de incubación a 37 °C, las placas se lavaron y la actividad neuraminidasa se midió subsecuente por la adición de aglutinina de cacahuate marcada con peroxidasa (2.5 $\mu\text{g/ml}$; Sigma), incubación por 1 h a temperatura ambiente, lavado de las placas y adición de 100 μl de sustrato de peroxidasa (TMB) a cada pozo. Después de 5 minutos, se detuvo la reacción por la adición de 100 μl de 0.3 M ácido fosfórico y los valores de DO se midieron a 450 nm por medio del uso de un lector de ELISA (EL-808 [BioTEK]).

1.4 Inmunizaciones de ratones con formulaciones de proteínas oligoméricas.

Cuatro grupos de diez ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas de edad se inmunizaron tres veces intranasalmente con un intervalo de 10 días, con 4 formulaciones de HA diferentes (H1M): (i) HA trimérica soluble (HA^{tri}) [1 μg por dosis]; (ii) HA trimérica soluble mezclada con BLP (BLP+ HA^{tri}) [1 μg HA^{tri} y 0.3 mg BLP por dosis]; (iii) HA trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-HA^{tri}) [1 μg HA^{tri} y 0.3 mg BLP por dosis], e (iv) HA monomérica (HA-P2L^{mon}) unida a BLPs (BLP-HA^{mon}) [1 μg HA^{mon} y 0.3 mg BLP por dosis]. Catorce días después de la 3^{ra} inmunización, el suero y los lavados nasales se recogieron para el análisis por ELISA para determinar la respuesta IgG anti-H1M (muestras de suero) y S-IgA anti-H1M (lavado nasal).

60

Para este propósito, las placas se recubrieron con 200 ng HA (H1M) por pozo. Las diluciones seriadas del suero se incubaron por 90 min y la unión de IgG e IgA específicas por H1M, respectivamente, se detectó por medio del uso de conjugados anti-ratón IgG e IgA-HRP (Southern Biotech). Para una curva de calibración la IgG de ratón se diluyó en triplicado (primer pozo 0.5 µg/mL) (IgG1 de ratón, Sigma) (solamente para la IgG del suero). Después de la tinción, la absorbancia a 492 nm se determinó en un lector de placas de microtitulación de ELISA. Para calcular los anticuerpos IgG anti-HA específicos en el suero (expresados en µg/mL) se usó la curva de calibración (los parámetros de la curva determinados por 4-parámetros de ajuste). Para calcular los anticuerpos IgA anti-HA específicos en el lavado nasal (expresados en títulos que son el recíproco de la dilución de la muestra calculada correspondiente con una A492 =0.3 después de la corrección del fondo) los parámetros de la curva se determinaron por 4-parámetros de ajuste. Los títulos de inhibición de la hemaglutinación (HI) específica por HA se determinaron por medio del uso del suero recogido en el día 34 (cada animal individual) de cada grupo. Las muestras de suero se inactivaron a 56 °C por 30 min y subsecuentemente se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con caolín para reducir la inhibición de la hemaglutinina específica por α . Las muestras tratadas con caolín se aplicaron a las placas en duplicado en diluciones dos veces seriadas por medio del uso de una pipeta multicanal y se mezclaron con el virus de la influenza inactivado homólogos apropiado (A/California/07/2009 (H1N1), 4 HAU; NIBSC, Reino Unido) y se incubaron por 40 min a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se añadió una solución de eritrocitos de conejillo de indias 1% a cada pozo. La hemaglutinina se dejó proceder por dos horas y se calificó por la más alta dilución a la cual se observó hemaglutinación.

Dos grupos de 10 ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas de edad se inmunizaron tres veces intranasalmente con un intervalo de 10 días, con dos formulaciones diferentes de BLP-F^{tri}: (i) F unida a BLPs (BLP- F^{tri} baja) [0.6 µg F^{tri} y 0.5 mg BLP por dosis]; y (ii) F unida a BLPs (BLP- F^{tri} alta) [2.2 µg F^{tri} y 0.5 mg BLP por dosis]. Catorce días después de la 3^{ra} inmunización, se recogieron las muestras de suero y se agruparon por grupos para un análisis de ELISA de competencia Synagis[®] para determinar el nivel de anticuerpos tipo Synagis[®] inducidos. Para este propósito, las placas se recubrieron con 100 ng de F por pozo. Diluciones seriadas del suero (lo que incluye el suero pre-inmune) se incubaron por 90 min seguido por un lavado. A continuación, las placas se incubaron con cantidades sub-saturantes de Synagis[®]. Después de la incubación, el Synagis[®] no unido se transfirió a una segunda placa recubierta con F y, después de la unión, se detectó por medio del uso de un anticuerpo secundario anti-IgG humana. El desarrollo del color se midió a 492 nm.

1.5 Inmunizaciones de ratas algodón con F-Protan oligomérica y reto subsecuente con RSV.

Cuatro grupos de 5 ratas algodón adultas jóvenes (6-8 semanas de edad) se inmunizaron tres veces con un intervalo de 14 días con 4 formulaciones diferente: (i) PBS (control negativo), (ii) F monomérica soluble (F^{mon}) [4 µg por dosis]; (iii) F trimérica (F-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-F^{tri}) [4 µg HA^{tri} y 0.5 mg BLP por dosis], y (iv) vacuna RSV inactivada con formalina formulada en sales de aluminio (FI-RSV) [Lote#100 (1:125)]. Los grupos 1 a 3 se vacunaron intranasalmente y el grupo 4 intramuscularmente,

En los días 0, 28 y 42 el suero se recogió para el análisis de neutralización de virus. Para este propósito, el suero inactivado por calor se diluye en serie en una placa de 96 pozos. A cada pozo se añaden 25 a 50 unidades formadoras de placa (PFU). Las placas de dilución se incuban por 1 hora a 25-30 °C para permitir a las muestras de suero y los virus interactuar. A continuación la mezcla de virus y suero se transfiere a células HEp-2 para la titulación de los virus. Las células se incuban con la mezcla por 1h seguido por la adición de una cubierta de metil celulosa. Las células se incuban 4 días a 37 °C después de lo que se retira la cubierta. Se añade tinción con cristal violeta y se deja fijar por 2 a 4 horas a 25-30 °C. La tinción se elimina por enjuague con agua fría. A continuación se dejan secar al aire completamente antes de la lectura. El número de unidades formadoras de placa (PFU) por pozo por medio del uso de un microscopio de disección. En el día 42 cada animal se retó con 100 µL de RSV/A/Largo a 10⁵ pfu por animal. En el día 5 después del reto los animales se sacrificaron y los pulmones se colectaron *en bloque* y bi-seccionaron para la titulación viral (sección izquierda) e histopatología (sección derecha). Las secciones de histopatología se calificaron para neumonía intersticial y alveolitis.

Ejemplo 1. Expresión de proteínas de fusión HA-Protan, F-Protan y protan-NA

Con el objetivo de expresar las proteínas quiméricas solubles HA-Protan, F-Protan y Protan-NA en células de mamífero, las secuencias que codifican el ectodominio primero se clonaron en vectores de expresión adecuados. En el vector pCD5 que expresa las proteínas de fusión HA-Protan, la secuencia del ectodominio de HA estaba precedida por una secuencia que codifica el péptido señal, para permitir la secreción eficaz de la proteína recombinante, y seguido por una secuencia que codifica una de las cuatro variantes de dominio Protan y un motivo de trimerización GCN4 artificial (GCN4-pII; OMD) entre las variantes de dominios HA y Protan (Figura 1A). Para las tres variantes de proteína de fusión HA-Protan que se expresaron y secretaron más eficazmente (ver más abajo) además construimos y expresamos proteínas de fusión que carecían de secuencia de trimerización GCN4 (OMD; Figura 1B).

En el vector pCD5 que expresa las proteínas de fusión HA-Protan, la secuencia del dominio principal NA estaba precedida

por una secuencia que codifica el péptido señal, para permitir la secreción eficaz de la proteína recombinante, y por una secuencia que codifica una variante del dominio Protan (un dominio LysM) ya sea con o sin un motivo de tetramerización artificial GCN4 (GCN4-pLI; OMD) colocado entre el dominio Protan y la secuencia NA (Figura 8A).

5 En el vector pCD5 que expresa las proteínas de fusión F-Protan, la secuencia del ectodominio de F estaba precedida por una secuencia que codifica el péptido señal, para permitir la secreción eficaz de la proteína recombinante, y seguido por una secuencia que codifica una variante del dominio LysM y un motivo de trimerización GCN4 artificial (GCN4-pII; OMD) entre F y el dominio LysM (Figura 10A). Además construimos y expresamos dos proteínas de fusión F-Protan que carecían de la secuencia de trimerización GCN4 (OMD) con uno y dos dominios LysM, respectivamente (Figura 10B).

10 La expresión de las proteínas de fusión HA-Protan, F-Protan y Protan- NA con o sin un motivo de multimerización artificial trimérico, trimérico o tetramérico GCN4 (OMD), respectivamente, se logró por la transfección de los plásmidos de expresión en células HEK293. La expresión y secreción de las proteínas HA-Protan, F-Protan y Protan-NA se verificaron al someter los sobrenadantes de cultivo celular a electroforesis en gel seguido por transferencia de tipo Western por medio del uso de un anticuerpo dirigido contra el resto Protan (α -PA90). Las proteínas de fusión HA-Protan y las proteínas de fusión F-Protan que contienen el dominio GCN4 (OMD) se abrevian HA-P^{tri} y F- P^{tri}, respectivamente, lo que indica la trimerización potencial de estas proteínas de fusión. Las fusiones HA-Protan y F-Protan que carecen del dominio GCN4 (OMD) se abrevian HA-P^{mon} y F-P^{mon}, respectivamente, lo que indica el estado monomérico de las proteínas. Igualmente, las fusiones Protan-NA se abrevian: P-NA^{tet} para las variantes que contienen el dominio GCN4 (OMD) que indica la tetramerización potencial de la proteína de fusión y P-NA^{mon} para las variantes que carecen del dominio GCN4 (OMD) que indican el estado monomérico de la proteína. Todas las variantes HA-P de ambas HAs derivadas de los virus de la influenza X31 y H1M se expresaron fácilmente y secretaron eficazmente al medio de cultivo celular con solamente mínima retención de la proteína de fusión en las células, como se muestra en la Figura 7A para las variantes HA-P^{tri}. Las proteínas de fusión X31 HA-P^{tri} se produjeron algo menos abundantes en comparación a las proteínas HA-P^{tri} de H1M. Mientras pueden ocurrir diferencias en los niveles de expresión de las especies HA, en general parece que HA fusionada a P1L y P2L muestran los más altos niveles de producción con la retención más limitada de proteína de fusión en las células en comparación con las variantes P1 y P2, respectivamente. Similar a las proteínas HA-Protan, se encontró que todas las variantes Protan-NA y F-Protan se secretaron al sobrenadante de cultivo celular (Figura 8B y 10C). Solamente se observó una limitada retención intracelular para las variantes de Protan-NA que contienen el motivo de tetramerización GCN4 (Figura 8B).

30 Claramente, la presencia en el N- o C-terminal de las variantes del dominio Protan bacteriano no interfirió con la secreción eficaz de las proteínas de fusión oligoméricas HA- y NA- por las células de expresión de mamífero.

35 Ejemplo 2 La unión de las proteínas de fusión HA-GCN-Protan, F-GCN-Protan y Protan-GCN- NA a BLPS

Las características de la unión de las diferentes proteínas de fusión HA-Protan, F-Protan y Protan-NA a BLPs se determinaron por la comparación de la unión a BLPs en presencia de una cantidad en exceso de las diferentes proteínas de fusión Protan. Los análisis de SDS-PAGE y transferencia de tipo Western demostraron que todas las variantes HA-P^{tri} se unieron. El dominio GCN4 mejora fuertemente las propiedades de unión de las construcciones de dominio LysM único (1L). Esto se demostró en un experimento con varias construcciones HA-P que estaban unidas a BLPs. La Figura 1C y D muestra tres variantes de HA-Protan que carecen de OMD GCN4 que se probaron por duplicado: variante de Protan P2L^{mon}, variante de Protan P1L^{mon} y variante de Protan P1^{mon} en comparación a la proteína de fusión HA-Protan que contiene GCN4 con la variante de Protan P1L^{tri}. Los resultados de la tinción con Coomassie (paneles I) consistentemente demostraron una pobre (H1M) o casi ninguna (X31) unión cuando la extensión contenía solo un dominio LysM en la construcción monomérica que carece de un dominio GCN4 (P1L^{mon} y P1^{mon}). La unión más eficaz ocurrió cuando la proteína de fusión monomérica tenía 2 dominios LysM (P2L^{mon}) como se esperaba. En contraste, en el caso de la proteína de fusión HA-Protan con GCN4, ya se logró una unión eficaz con 1 dominio LysM (P1L^{tri}). Claramente, a diferencia de para las proteínas de fusión monomérica HA-Protan, un único motivo LysM ya es suficiente para una unión eficaz de las formas triméricas de HA -Protan.

50 En otro experimento, la eficacia de unión de una construcción HA con un dominio LysM único combinado con un OMD (HA-GCN4-P1L o HA-P1L^{tri}) se comparó con una construcción monomérica de HA con dos dominios LysM (Figura 3). Para este propósito, cantidades crecientes (0 - 4 μ g) de HA-P1L^{tri} y HA-P2L^{mon} las cuales ambas mostraron una unión eficaz a BLPs (ver Figura 1C/D) se dejaron unir a una cantidad fija (0.3 mg) de BLPs. Claramente más HA-P1L^{tri} se unió a BLPs a concentraciones similares a las usadas para HA-P2L^{mon}. Por lo tanto, la unión de proteínas a BLPs por medio del uso de un dominio LysM único combinado con un OMD tal como GCN4 en una construcción oligomérica es más eficaz que con dos dominios LysM en una construcción monomérica.

60 En otro experimento (Figura 5A) la estabilidad de la unión de HA-GCN4-P1L a BLP se evaluó a partir del almacenamiento a largo plazo en PBS a 2-8 °C. Los datos muestran que una construcción de HA con un dominio LysM único combinado con un OMD permanece establemente unida a BLPs por al menos 9 meses. Esto es en fuerte contraste a las observaciones de

Raha y otros (2005) y Moeini y otros (2010) cuyos experimentos mostraron una pérdida de la unión de proteínas con un dominio LysM único a las bacterias por encima del 40% en 5 días de almacenamiento.

5 La unión a BLP de las diferentes proteínas de fusión Protan-NA y F-Protan corroboraron las observaciones con las construcciones de HA de que un dominio LysM único combinado con un OMD resulta en una unión eficaz. En la Figura 8D y 10C, se obtuvo ninguna o pobre unión para las proteínas de fusión P1L-NA^{mon}, P1-NA^{mon} y P1L-F^{mon} que carecen de un motivo de multimerización GCN4 como se observó para las construcciones HA-P1^{mon}. Sin embargo, se observó una unión claramente eficaz de BLP con las proteínas de fusión F-P1L^{tri}, F-P2L^{mon} y P1L-NA^{tet}.

10 Como un control mostramos que el OMD por sí mismo no hace posible la unión a las partículas BLP. Para este propósito, se comparó la unión de HA-Strep^{tri}, que porta una etiqueta Strep en lugar de una extensión Protan, y HA-1L^{tri} a partículas BLP. La Figura 7C muestra una transferencia de tipo Western en la que HA-Strep^{tri} (línea 3) se mezcló con BLPs. Las BLPs se recuperaron y cargaron en el gel (línea 4). Ninguna unión de HA-Strep^{tri} ocurrió. En contraste, se observó una unión eficaz para HA-1L^{tri} (comparar líneas 5 y 6).

15 Adicionalmente, para ambas proteínas HA derivadas de virus H1M (Figura 1C) y X31 (Figura 7B), las variantes HA-P1^{tri}, HA-P1L^{tri} y HA-P2L^{tri} se unieron a BLPs más eficazmente. Se observó una baja eficacia de unión para las proteínas HA-P2^{tri} de H1M1 y X31 a BLPs. Esto además se observó para las construcciones P1-NA^{tet} que carecen de un enlazador entre el dominio LysM y el dominio OMD, que mostraron una unión pobre. Claramente, se necesita un dominio enlazador entre el dominio LysM y el OMD para una unión correcta a BLPs.

20 En la situación natural como se observó en la AcMA monomérica, 3 dominios intramoleculares consecutivos LysM (en cis) facilitan la unión eficaz. La reducción de este número a 1 dominio LysM resulta en una fuerte reducción de la eficacia de unión (Bosma y otros [2006]) y baja estabilidad (Raha y otros [2005] y Moeini y otros [2010]). En conjunto, nuestros resultados indican que un dominio LysM único puede facilitar una unión altamente eficaz y estable a BLPs cuando se coloca en una conformación multimérica intermolecular (dominios LysM que interactúan *en trans*) donde las subunidades, cada una que contiene un dominio LysM único, se multimerizan por un OMD. Además, un dominio enlazador presente entre el dominio LysM y el OMD aumenta más aun la eficacia de producción y unión.

25 El uso de un dominio LysM único tiene varias ventajas: (i) reduce el tamaño del dominio de unión y, (ii) previene la unión de las fusiones monoméricas inferiores inmunogénicas como aún puede ser el caso cuando se usan 2 o más dominios LysM (HA-P1L^{mon} no se une vs HA-P2L^{mon} se une a BLPs, ver Figura 1C y D, paneles I y II; F-P1L^{mon} no se une vs HA-P2L^{mon} se une a BLPs, ver Figura 10C). Por lo tanto, un dominio LysM único facilita la unión selectiva de las formas inmunogénicas más relevantes (es decir multiméricas) de las proteínas de fusión (ver Figura 2).

30 Ejemplo 3 Funcionalidad de las proteínas de fusión HA-GCN-Protan y Protan-GCN-NA

Estado oligomérico de las proteínas de fusión

35 El estado oligomérico de las proteínas HA-Protan y Protan-NA con o sin un OMD artificial, el motivo de multimerización trimérico o tetramérico GCN4, respectivamente, se analizó por electroforesis en gel nativa azul. Muestras de las proteínas de fusión HA-Protan que se mostró que se unen a BLPs, es decir las proteínas derivadas del virus H1M HA-P1^{tri} y HA-P1L^{tri} se hirvieron por 10 segundos, 30 segundos o 3 minutos con el objetivo de disociar los trímeros HA. Todas las proteínas HA-P^{tri} migraron en el gel con una movilidad de acuerdo con la de un trímero cuando se calienta brevemente (ebullición por 10 sec) y estos trímeros HA se disociaron en formas díméricas y monoméricas de HA después de la ebullición prolongada de la muestra (Figura 1E, paneles de la izquierda). Los trímeros HA-P1^{tri} y HA-P1L^{tri} permanecieron detectables aun después de la ebullición prolongada de las muestras. En contraste, todas las variantes HA-P^{mon} equivalentes migraron con la movilidad de un monómero. Adicionalmente, la mayoría de estas proteínas HA-P^{mon} exhibieron una tendencia variable, pero a veces fuerte a formar agregados de alto peso molecular (Figura 1E, paneles de la derecha, indicados por los asteriscos), probablemente como un resultado del pobre plegado y estabilidad de estas proteínas no nativas.

40 Las muestras de las variantes de P1L-NA con y sin GCN4 se analizaron por electroforesis en gel nativa azul (Figura 8C). La mayor parte de la proteína P1L-NA^{mon} migró como un monómero, parte de ella como un dímero, sin embargo no se pudo detectar ningún tetramero. En contraste la proteína P1L-NA^{tet} migró de acuerdo con un tetramero sin detección de monómeros o dímeros.

45 Estos datos claramente demuestran que la presencia de un OMD tal como el motivo GCN4 se requiere para obtener proteínas estables oligoméricas que tienen una estructura nativa cuaternaria.

50 *Actividad Biológica de las proteínas de fusión*

La actividad biológica de la HA nativa como se presenta en las partículas se puede evaluar por un ensayo de hemaglutinación por medio del uso de eritrocitos (Figura 4A). Con este ensayo se evalúa la función de unión del receptor de ácido siálico de la proteína HA - una propiedad biológica exhibida únicamente por la HA trimérica. Con el objetivo de demostrar que la aglutinación en el ensayo descrito es críticamente dependiente de la presencia de oligómeros de HA unidos a BLPs más que de monómeros de HA unidos a BLPs, HA-P1L^{tri} y HA-P2L^{mon} (ambas H1M) se unieron a BLPs. La Figura 4B muestra claramente que HA-P1L^{tri} unida a BLPs es capaz de causar la aglutinación de los glóbulos rojos en una forma dependiente de la concentración (líneas 3-6), mientras HA-P2L^{mon} unida a BLPs no es capaz de causar aglutinación (líneas 8-11). Estos resultados muestran claramente que solamente las formas oligoméricas de HA unidas a BLPs son biológicamente activas.

La funcionalidad biológica de las proteínas P1-NA y P1L-NA solubles monoméricas y oligoméricas se estudió por la medición de su actividad sialidasa por medio del uso de un ensayo de unión en base sólida con la glicoproteína sanguínea sialidada fetuina como el sustrato. La desialilación por Protan-NA se midió por medio de la actividad de unión a la lectina PNA como se detalló en la sección de Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 9, las proteínas Protan-NA^{tet} que contienen el motivo de tetramerización GCN4 exhibieron una actividad sialidasa dependiente de la concentración. No se encontró actividad sialidasa para las proteínas de fusión Protan-NA que carecían del motivo de tetramerización GCN4 (P-NA^{mon}). Estos resultados demostraron claramente que las formas oligoméricas (pero no las monoméricas) de Protan-NA son funcionales.

En conclusión, las proteínas biológicamente activas, soluble trimérica HA y soluble tetramérica NA fusionadas a diferentes variantes de Protan se produjeron eficazmente en células de mamíferos. La unión eficaz a BLPs ya se logró con 1 dominio LysM, siempre que la proteína de fusión contuviera un OMD, tal como el dominio de oligomerización GCN4; en otras palabras, la unión eficaz mediada por un dominio LysM único depende de - y selecciona para - las proteínas que se encuentran en estado oligomérico. Además, las proteínas unidas en su estado oligomérico a BLP demostraron una actividad biológica que es similar a las proteínas nativas.

Ejemplo 4 Inmunogenicidad de la HA-Protan oligomérica en forma particulada

La inmunogenicidad de la HA trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-HA^{tri}) se evaluó después de dos administración intramusculares en ratones. El subtipo de HA usado fue H1M. La formulación particulada BLP-HA^{tri} se comparó con la HA trimérica soluble (HA^{tri}) y HA trimérica soluble mezclada con BLP (BLP+ HA^{tri}). La cantidad de HA^{tri} en las formulaciones fue 0.33 µg por dosis. Diez días después de la 2^{da} inmunización el suero se recogió y agrupó por grupo para el análisis por ELISA para determinar la respuesta IgG anti-H1M. Los resultados en la Figura 6A muestran claramente que las formulaciones particuladas BLP-HA fueron las formulaciones más inmunogénicas con respecto a la respuesta IgG del suero específica por HA en comparación a la HA trimérica soluble (HA^{tri}) y HA trimérica soluble mezclada con BLP (BLP+ HA^{tri}). Altamente relevante, sin embargo, es la observación (Figura 6B) de que la HA trimérica unida a BLPs (BLP-HA^{tri}) provoca títulos de anticuerpos funcionales más altos en comparación a la HA monomérica unida a BLPs (BLP-HA^{mon}) medidos como los títulos de inhibición de la aglutinación (HI). Adicionalmente, solamente la HA trimérica unida a BLPs (BLP-HA^{tri}) provoca niveles significativos de IgA secretada específica por HA (S-IgA) en las secreciones mucosas de la nariz (Figura 6C). Estos resultados son con mayor probabilidad un reflejo del plegamiento y funcionalidad correctos de la HA trimérica unida a BLPs (BLP-HA^{tri}).

Por lo tanto, formulaciones de BLP particuladas que contienen composiciones oligoméricas nativas unidas, establecidas mediante el uso de un OMD y un dominio LysM único, son altamente inmunogénicas y provocan una respuesta más potente, cualitativamente más relevante que las formulaciones unidas oligoméricas y monoméricas solubles.

Ejemplo 5. Inmunogenicidad, eficacia y seguridad de F-Protan oligomérico en forma particulada

La inmunogenicidad de la F trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-F^{tri}) se evaluó después de dos administración intranasales en ratones. Se usaron tres dosis (0.6 y 2.2 µg por dosis) de la formulación particulada BLP-F^{tri}. Diez días después de la 3^{ra} inmunización, se recogió el suero y se agrupó por grupos para un análisis de ELISA de competencia Synagis[®] (Figura 11A) para determinar la respuesta de anticuerpos anti-F. En este ensayo, los anticuerpos provocados en los ratones por las vacunas que se unen a los epitopos de F reconocidos por los anticuerpos neutralizantes Synagis[®], previenen la unión de Synagis[®]. Así la cantidad medida de Synagis[®] no unida en el ensayo es una medida de los anticuerpos tipo Synagis[®] elevados por las vacunas. Los resultados en la Figura 11B muestran claramente que la F trimérica unida a BLPs (BLP-F^{tri}) provoca anticuerpos tipo Synagis[®] en una manera dependiente de la dosis. Los sueros pre-inmunes fueron negativos, como se esperaba.

En conclusión, las formulaciones de BLP particuladas que contienen antígeno F oligomérico nativo unido, establecidas

mediante el uso de un OMD y un dominio LysM único, son altamente inmunogénicas y provocan anticuerpos de tipo neutralizante.

5 Las ratas algodón recapitularon cercanamente el resultado patológico devastador, conocido como enfermedad aumentada, asociado con el fallo de la vacuna RSV en los 1960. En los 1960, se condujeron ensayos en niños en los Estados Unidos con la vacuna RSV inactivado en formalina formulada en sales de aluminio (FI-RSV). Durante las subsecuentes exposiciones a RSV natural, el índice de la infección viral en niños que recibieron la vacuna no fue menor (y fue quizá aun mayor) que la del grupo control inmunizado con la vacuna de parainfluenza. Lo más notable, el 80% de los vacunados con RSV necesitaron hospitalización, mientras que solamente el 5% de tales infecciones entre los vacunados con el control de parainfluenza requirieron la admisión en el hospital. Dos de los niños vacunados murieron. Así, en lugar de proteger; FI-RSV fue un candidato vacunal infame que predisponía a niños jóvenes para una enfermedad exacerbada a partir de la exposición a la infección con RSV natural. La administración de FI-RSV a ratas algodón seguida por la infección con RSV resulta en una patología aumentada (pulmón) comparable caracterizada por neumonía intersticial y alveolitis. Por esta razón las pruebas de seguridad (ausencia de enfermedad aumentada) de una vacuna de RSV conceptual en ratas de algodón es una etapa esencial en el desarrollo de vacunas de RSV.

20 La eficacia y seguridad (ausencia de síntomas de enfermedad aumentada) de F trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-F^{tri}) se evaluó después de tres administraciones intranasales en ratas algodón y se comparó a la F monomérica (F^{mon}). La capacidad de los anticuerpos del suero elevados por las vacunas de inhibir la replicación de RSV se determinó en ensayos de neutralización de virus en muestras tomadas 14 días después de la administración de cada vacuna. Para la evaluación de la seguridad, la vacuna de RSV inactivado en formalina formulada en sales de aluminio (FI-RSV) se dio intramuscularmente a un grupo adicional de animales. Se conoce que FI-RSV provoca patología en los pulmones de las ratas algodón que está relacionada con los signos de la enfermedad aumentada (neumonía intersticial y alveolitis). Catorce días después de las inmunizaciones finales cada animal se retó con RSV. En el día 5 después del reto los animales se sacrificaron y los pulmones se colectaron para la determinación de los títulos de virus, títulos de neutralización de virus y calificación de neumonía intersticial y alveolitis por histopatología. Los resultados muestran claramente (Figura 12A) que la F trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-F^{tri}) es más eficaz en la reducción de los títulos de virus en el pulmón en comparación a la F monomérica (F^{mon}). Estas observaciones correlacionan muy bien con la más alta capacidad de neutralización de virus de los sueros de animales inmunizados con BLP-F^{tri} en comparación a aquellos de F^{mon} (Figura 12B). Es importante destacar, que la eficacia aumentada de la F trimérica (HA-P1L^{tri}) unida a BLPs (BLP-F^{tri}) se asocia con la carencia de signos de enfermedad aumentada (neumonía intersticial y alveolitis en los pulmones), que es típico para el uso de FI-RSV en este modelo (Figura 12C).

35 En conclusión, las formulaciones de BLP particuladas que contienen el antígeno F oligomérico nativo unido, establecidas mediante el uso de un OMD y un dominio LysM único, son altamente eficaces, provocan anticuerpos neutralizantes de virus y tienen un perfil de seguridad favorable.

Reivindicaciones

1. Una composición inmunogénica en forma particulada, que comprende:
- 5 i. una partícula tipo bacteria no viable (BLP) obtenida a partir de una bacteria Gram-positiva como portador particulado;
- 10 ii. oligómeros de un polipéptido producido de manera recombinante unido no-covalentemente a dicha BLP, en donde el polipéptido recombinante comprende:
- A) un dominio antigénico N- o C-terminal, que comprende al menos un polipéptido expuesto en la superficie de origen patogénico o tumoral, o la parte antigénica de este, el dominio antigénico se fusiona a
- B) un dominio de oligomerización (OMD), dicho dominio de oligomerización se fusiona a través de
- C) un dominio enlazador a
- D) un dominio de unión de péptidoglicano (PBD) consistente de una copia única de un dominio LysM que media la unión no-covalente del polipéptido a la BLP, y en donde el polipéptido en su conjunto contiene
- 15 solamente una copia única de un dominio LysM; y
- iii. un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
2. Composiciones inmunogénicas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido expuesto en la superficie en el dominio antigénico de dicho polipéptido recombinante comprende un ectodominio de una proteína de cubierta de virus, preferentemente en donde dicho virus es el virus de la influenza, coronavirus animal, coronavirus respiratorios humanos, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), o paramixovirus, en particular virus respiratorio sincitial (RSV) o metapneumovirus.
- 20 3. Composiciones inmunogénicas de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el polipéptido expuesto en la superficie o la parte antigénica de este se selecciona del grupo que consiste del ectodominio de la hemaglutinina (HA) de la influenza o parte de este, el ectodominio de la neuraminidasa (NA) de la influenza o parte de este, el ectodominio de la proteína de la punta del coronavirus (S) o parte de este, ectodominios de las glicoproteína F o G de RSV o partes de estos y el ectodominio de la gp 140 del HIV o parte de este.
- 25 4. Composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho dominio enlazador de dicho polipéptido recombinante consiste de entre 10 y 60, preferentemente 20-50, con mayor preferencia 25-40 aminoácidos, por ejemplo aproximadamente 30 aminoácidos.
- 30 5. Composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el dominio enlazador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de :
- 35 GASSAGNTNSGGSTTTITNNSGTNSST,
GSASSTNSGGSNNSASTTPTTSVTPAKPTSQ y
QSAASNPSTGSGSTATNNSNSTSSNSAS.
- 40 6. Composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el dominio de oligomerización (OMD) de dicho polipéptido recombinante es un dominio de dimerización, trimerización o tetramerización, preferentemente en donde dicho dominio de oligomerización se selecciona de dominio de di-, tri- o tetramerización basado en GCN4, secuencia del dominio C-terminal de T4 fibritina (foldon) o parte funcional o análogo de este (residuos 27 a 30 C-terminales) y el dominio de trimerización soluble de la proteína de la matriz de cartilago de pollo (CART).
- 45 7. Composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polipéptido recombinante además comprende, en el caso de un dominio antigénico N-terminal una secuencia de cubierta C-terminal, o en el caso de un dominio antigénico C-terminal una secuencia de cubierta N-terminal.
- 50 8. Composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha bacteria es una bacteria no patogénica, preferentemente una bacteria de calidad-alimentaria, con mayor preferencia en donde dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste de un *Lactococcus*, un *Lactobacillus*, un *Bacillus* y un *Mycobacterium ssp.*
- 55 9. Composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el portador particulado se proporciona no-covalentemente con al menos un primer oligómero de polipéptidos que comprende polipéptidos expuestos en la superficie o partes antigénicas de estos derivadas de un primer patógeno y un

segundo oligómero de polipéptidos que comprende polipéptidos expuestos en la superficie o partes antigénicas de estos derivadas de un segundo patógeno.

- 5
10. Método para proporcionar una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprenden las etapas de:
- 10
- a) proporcionar un polipéptido recombinante como se narró en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión que codifica dicho polipéptido en un medio adecuado que permita la expresión del polipéptido, y aislar el polipéptido;
 - b) proporcionar una partícula tipo bacteria no viable (BLP) obtenida de bacterias Gram-positivas.
 - c) permitir la unión no-covalente de dichos polipéptido(s) a dicho BLP para formar un complejo inmunogénico que comprende oligómeros de un polipéptido expuesto en la superficie de origen patógeno o partes antigénicas de este unido no-covalentemente a un portador particulado, y
 - d) formular el complejo inmunogénico en una composición inmunogénica.
- 15
11. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar en un método para provocar una respuesta inmune contra un patógeno en un individuo que comprende administrar dicha composición a dicho individuo.
- 20
12. Composición inmunogénica para usar de acuerdo con la reivindicación 11, para provocar una respuesta inmune contra una enfermedad viral en un individuo, preferentemente en donde la causa de la enfermedad viral es el virus de la influenza, el coronavirus animal, coronavirus respiratorios humanos, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), o paramixovirus, en particular el virus sincitial respiratorio (RSV) o el metapneumovirus.
- 25
13. Un polipéptido recombinante que comprende:
- A) un dominio antigénico N- o C-terminal, que comprende al menos un polipéptido expuesto en la superficie (por ejemplo de origen patógeno o tumoral) o una parte antigénica de este, el dominio antigénico se fusiona a
 - B) un dominio de oligomerización (OMD), dicho dominio de oligomerización se fusiona a través
 - C) un dominio enlazador a
 - D) un dominio de unión de péptidoglicano (PBD) consistente de una única copia de un dominio LysM capaz de mediar la unión no covalente del polipéptido a una partícula portadora de péptidoglicano que es una partícula tipo bacteria (BLP) no viable obtenida de una bacteria Gram-positiva, y en donde el polipéptido en su conjunto contiene solamente una única copia de un dominio LysM.
- 30
- 35
14. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14.
- 40
16. Una célula huésped, que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14 o un vector de acuerdo con la reivindicación 15, preferentemente en donde dicha célula huésped es una célula huésped eucariótica, con mayor preferencia una célula huésped de mamífero.

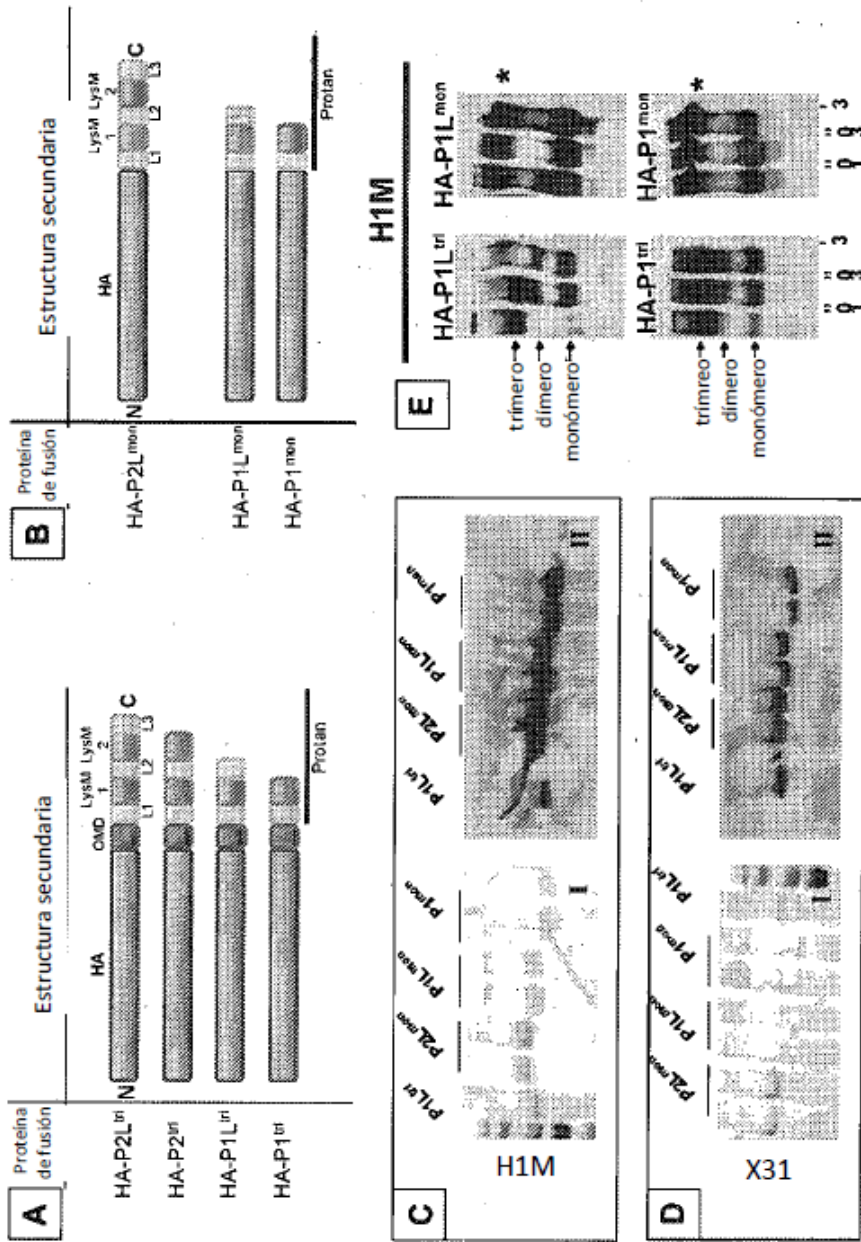


Figura 1

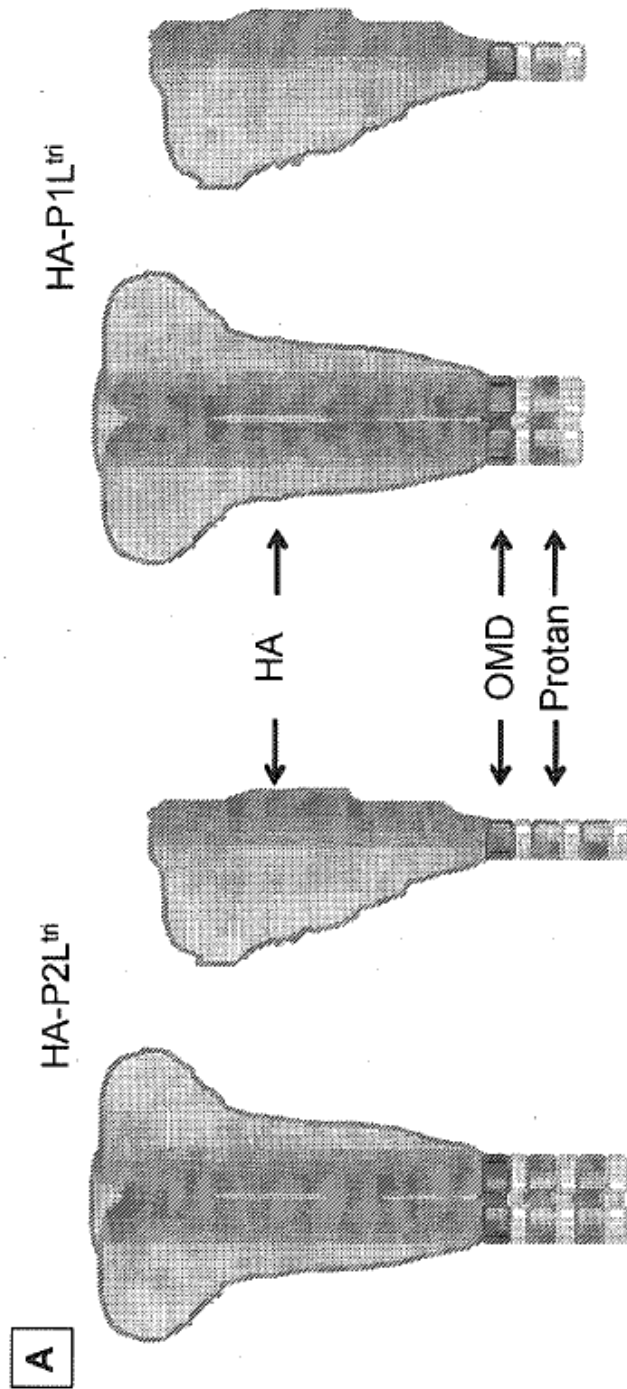


Figura 2A

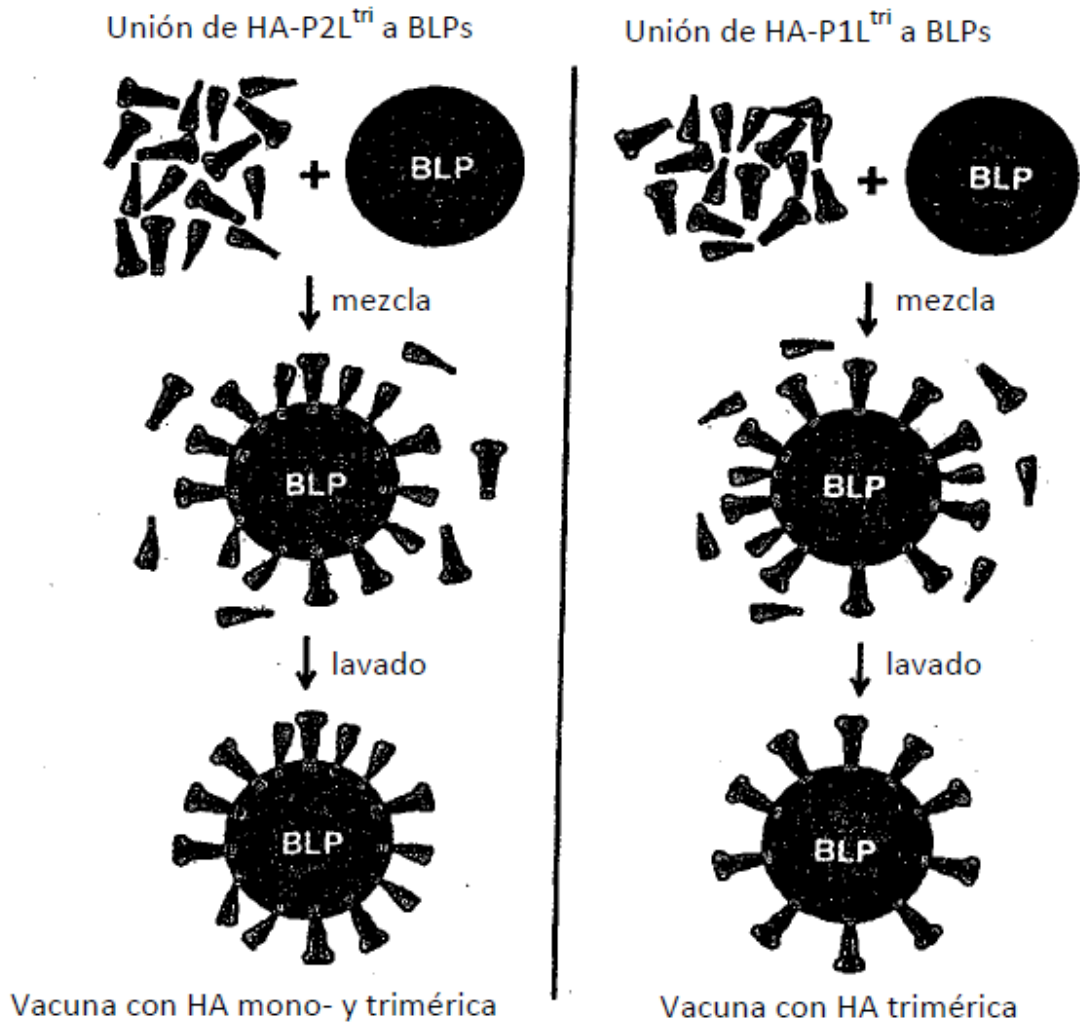
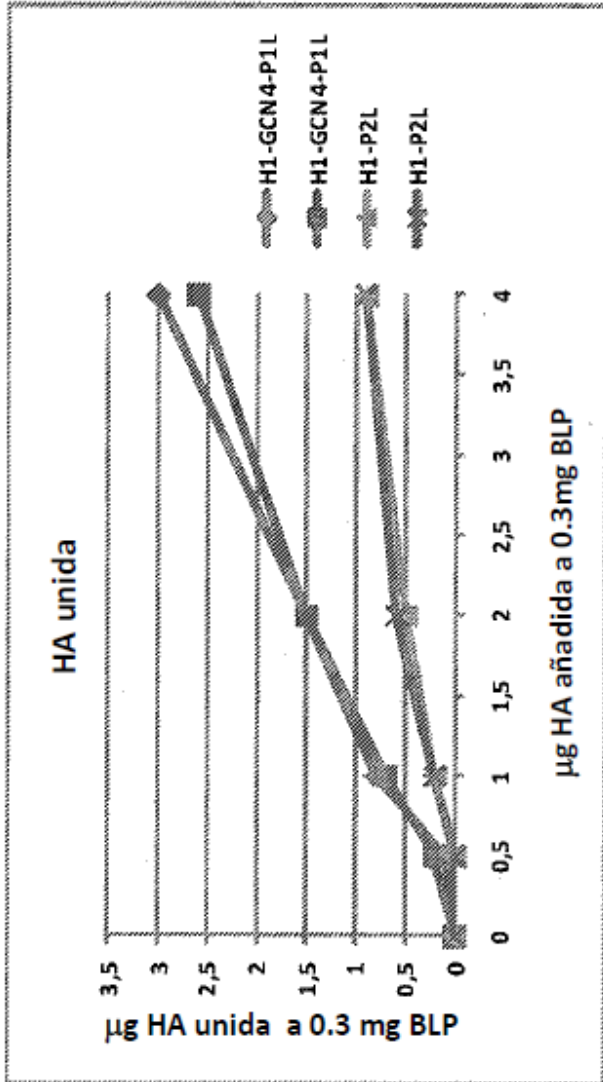


Figura 2b



µg HA añadida/0.3mg BLP	HA unida a 0.3 mg BLP (%)	
	H1-GCN4-P1L (HA-P1L ^{tr})	H1-P2L (HA-P2L ^{mcm})
4	75	23
2	75	26
1	80	20
0,5	20	0
0	0	0

Figura 3

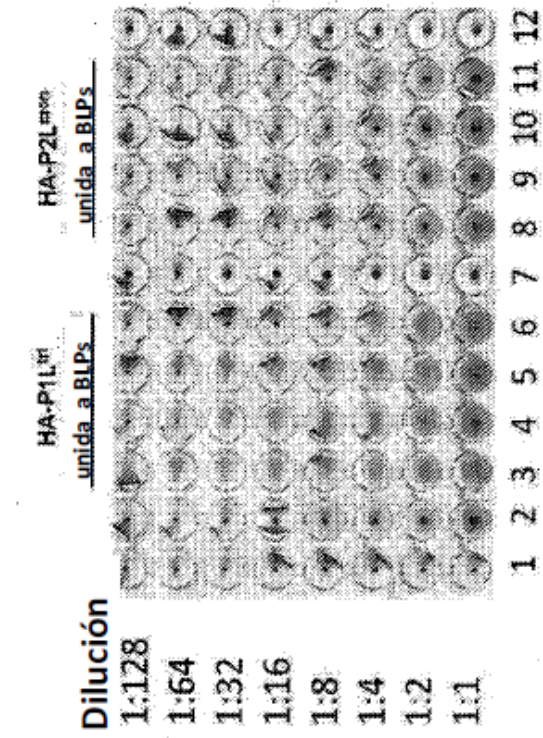
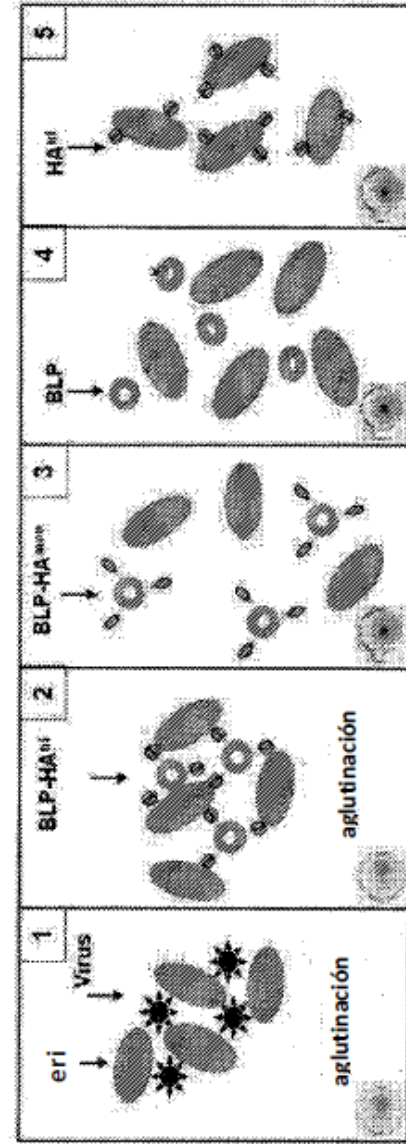


Figura 4

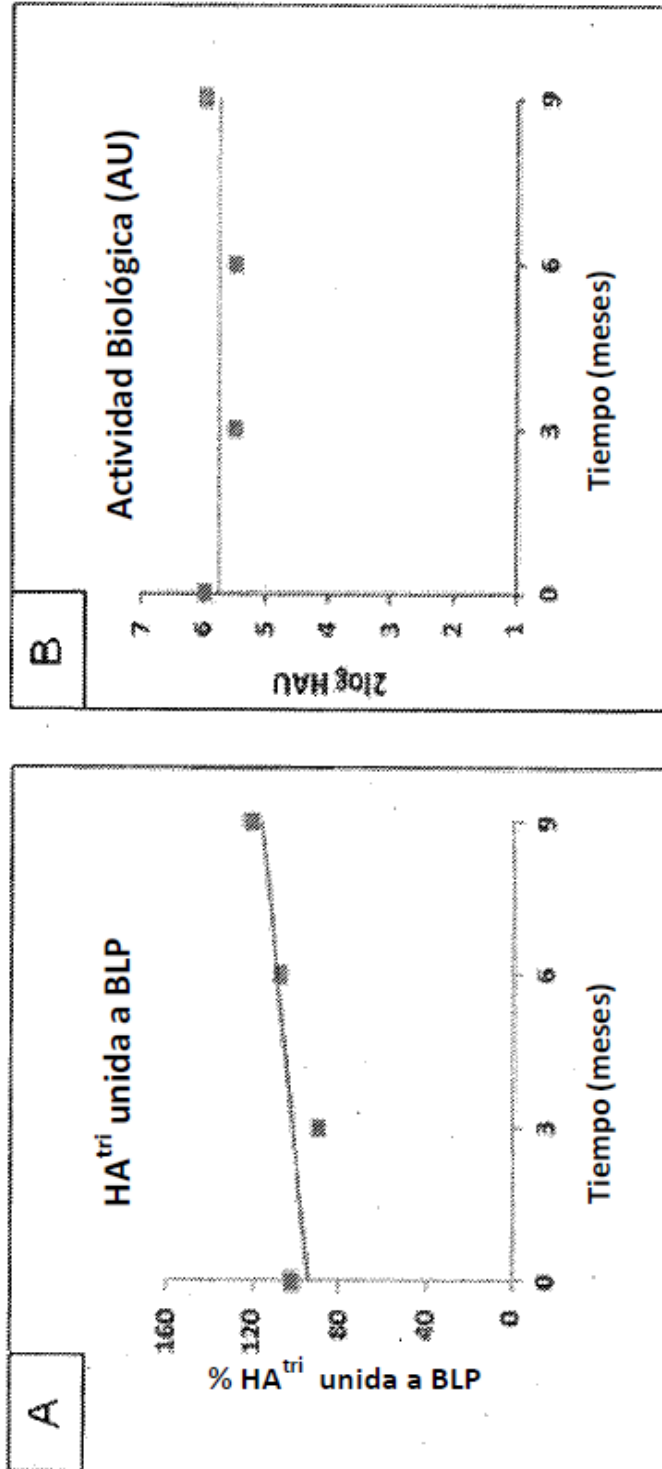


Figura 5

A/California/7/09 HA

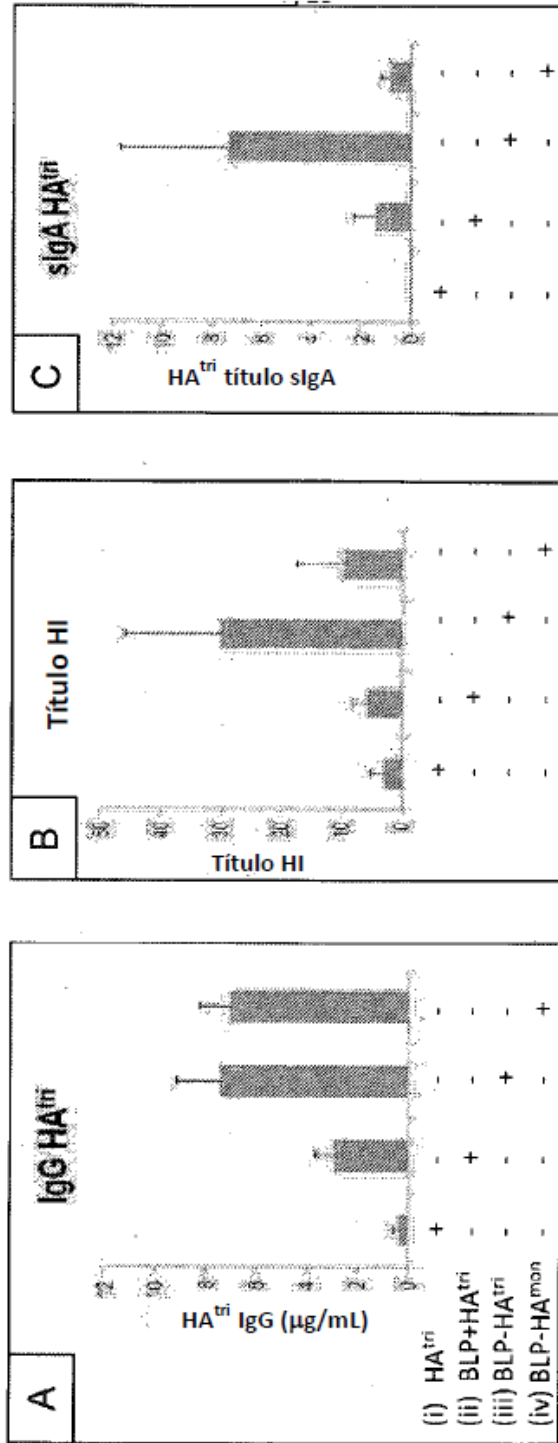


Figura 6

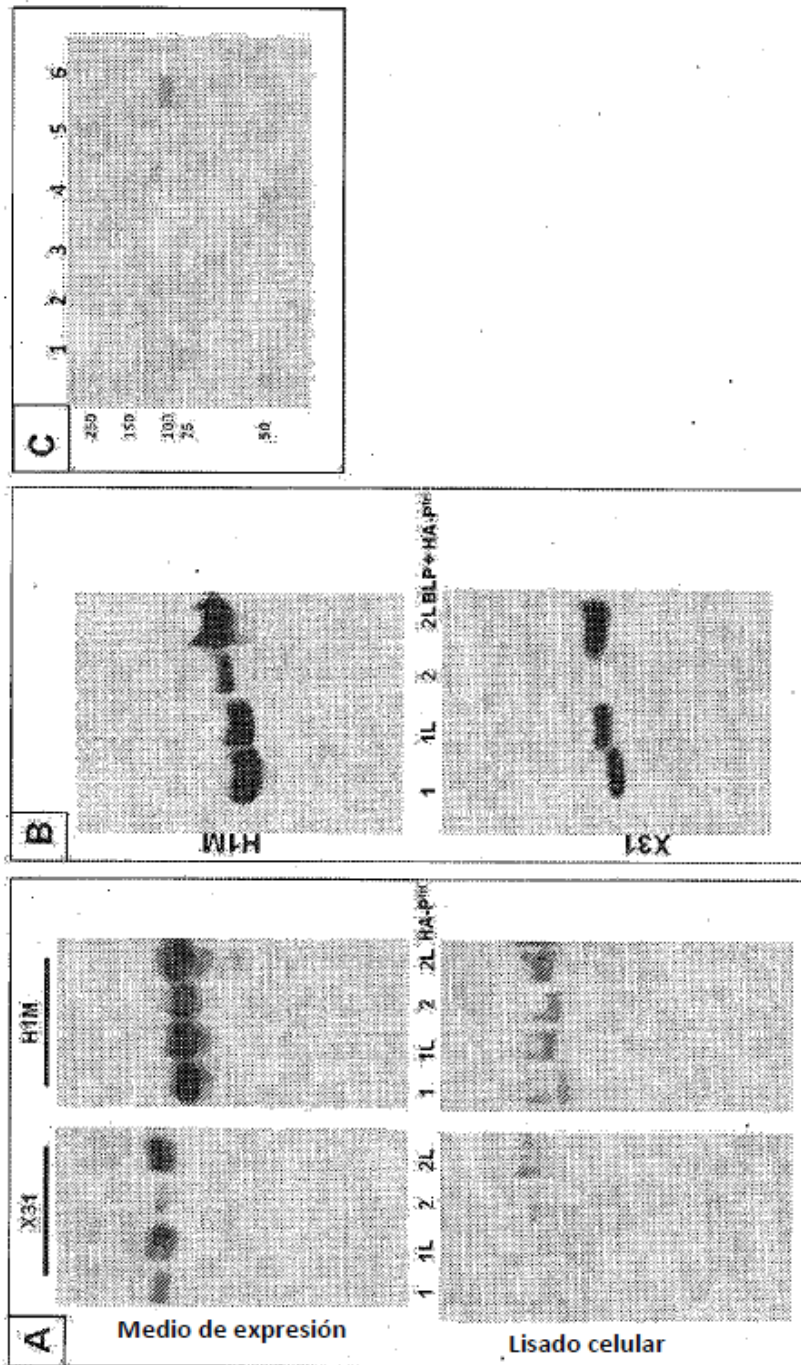


Figura 7

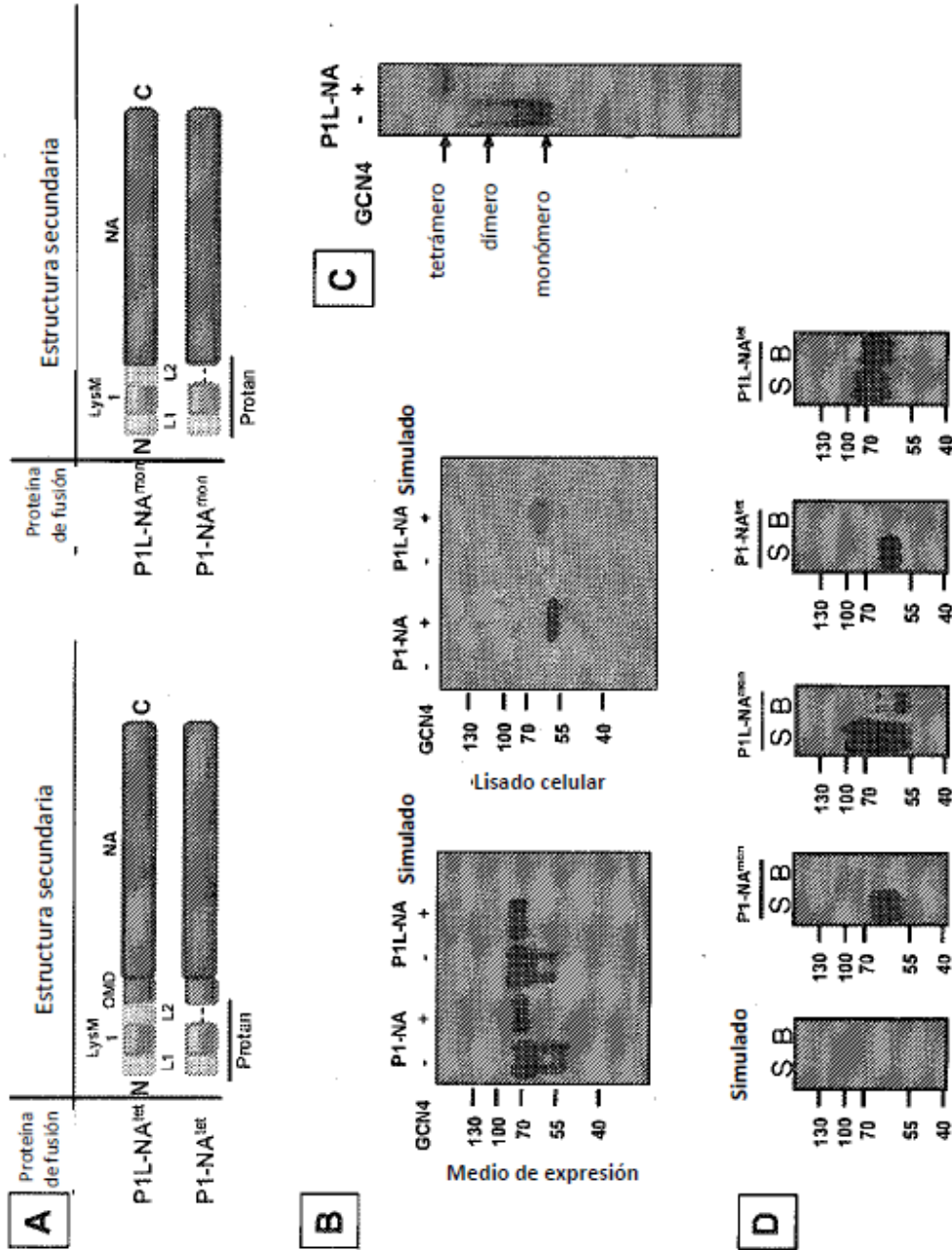


Figura 8

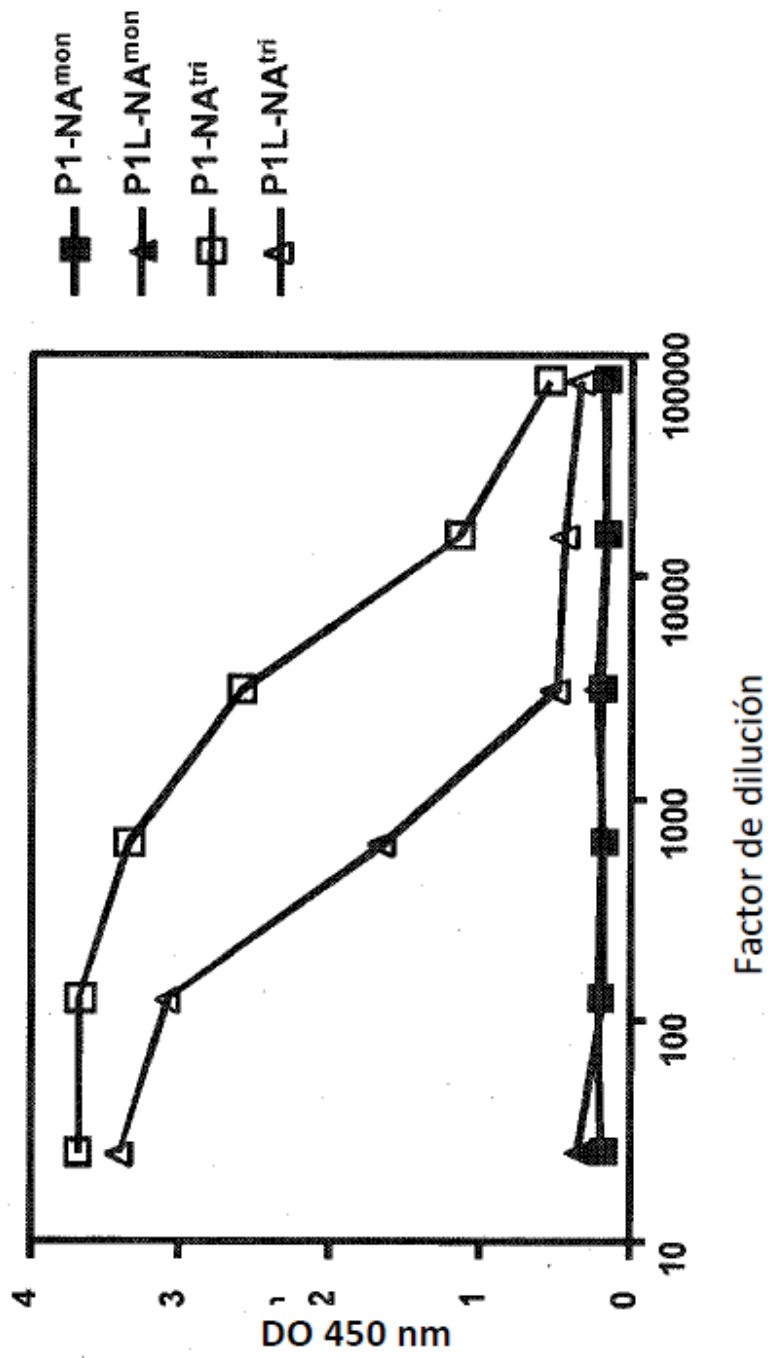


Figura 9

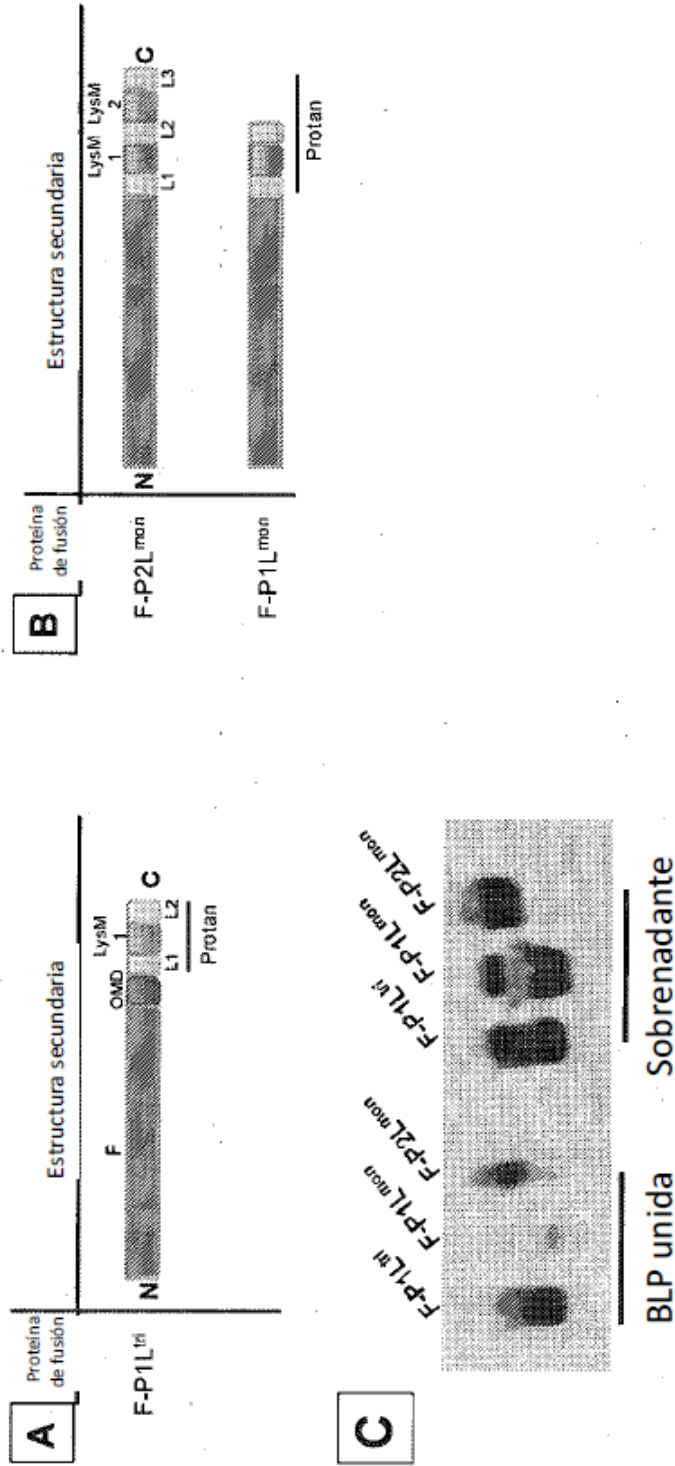


Figura 10

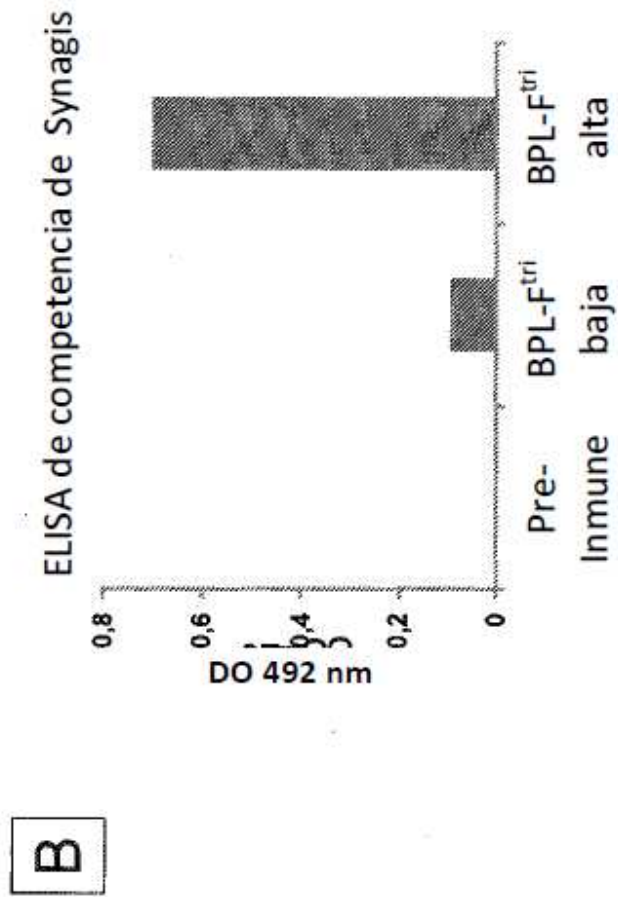
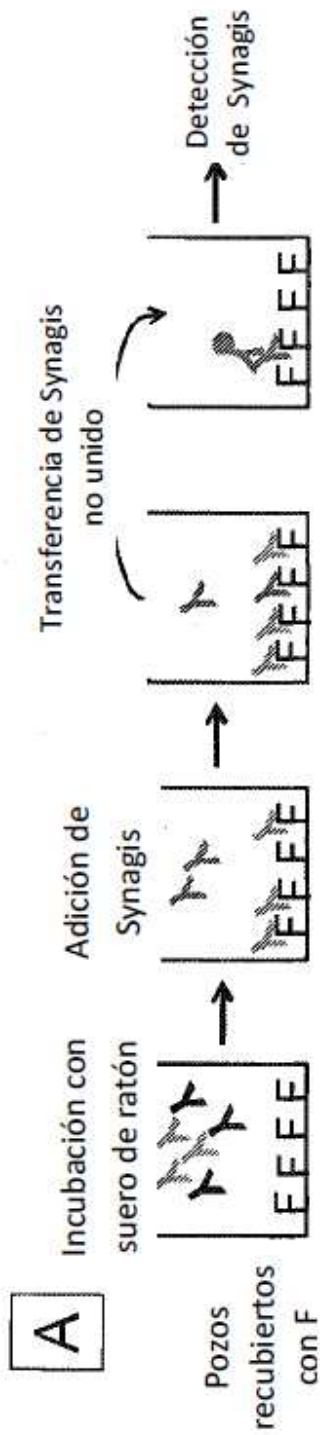


Figura 11

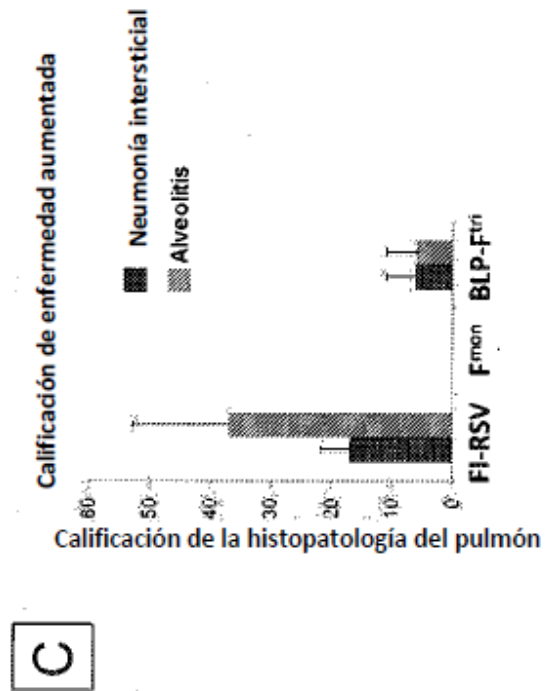
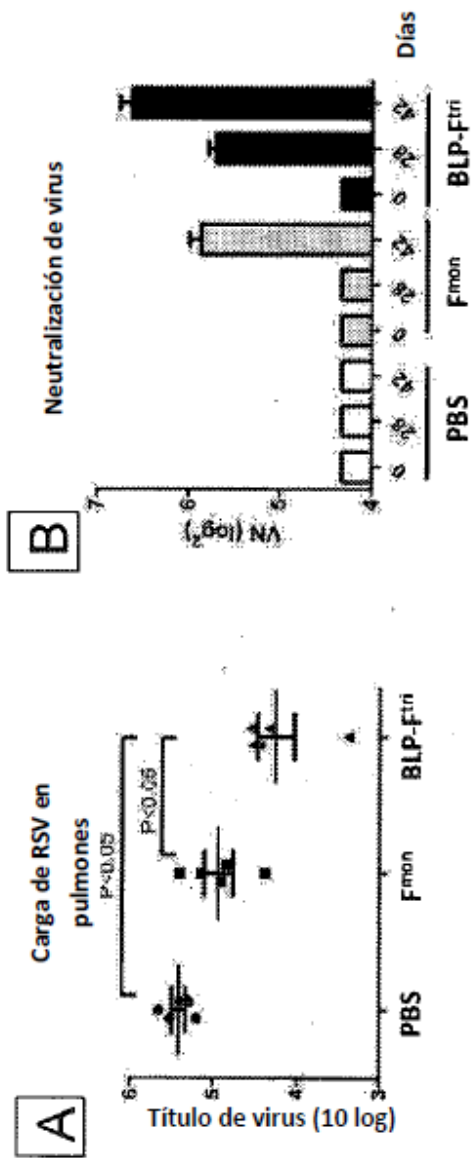


Figura 12