

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 637**

51 Int. Cl.:

A61K 39/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2013 PCT/EP2013/072717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2013 E 13789738 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2914284**

54 Título: **Vacunas basadas en partículas recombinantes contra la infección por el citomegalovirus humano**

30 Prioridad:

30.10.2012 EP 12190652

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

12.04.2017

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**WELLNITZ, SABINE;
JOHN, CORINNE y
SCHAUB, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 608 637 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas basadas en partículas recombinantes contra la infección por el citomegalovirus humano

Campo de la invención

5 La invención se refiere a partículas similares a virus que comprenden proteínas de la cápside, proteínas de la superficie de citomegalovirus y, opcionalmente, proteínas del tegumento y vacunas contra la infección por citomegalovirus humano.

Técnica anterior

10 El citomegalovirus humano (CMVH) se encuentra en todas partes del mundo y en todos los grupos socioeconómicos. Infecta al menos al 60 % de la población adulta; en algunos países ya se ha alcanzado una infección endémica del 100 %. Por lo general, la infección es asintomática en individuos inmunocompetentes; a veces, puede producirse una enfermedad similar a la mononucleosis. La infección conduce invariablemente a la creación de latencia durante toda la vida, que, de vez en cuando, puede interrumpirse por reactivación. Los individuos inmunodeficientes, tales como pacientes de trasplante/cáncer de inmunosuprimidos terapéuticamente o iatrogénicamente, neonatos y pacientes con VIH, presentan una significativa morbilidad y mortalidad como resultado de la infección por CMVH.

15 El tratamiento actual de la infección por CMV es el tratamiento con reactivos antivíricos, tales como ganciclovir (valganciclovir), foscarnet, aciclovir, cidofovir o leflunomida. La aplicación de tales agentes antivíricos ha sido aprobada para los receptores de trasplantes y pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, pacientes con VIH), pero no en mujeres embarazadas. Para éstos se prefiere una terapia con hiperinmunoglobulina. Además, las terapias antivíricas existentes conducen a resistencia vírica en un breve espacio de tiempo o no fueron eficaces durante el tratamiento (McGregor A. y col., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2011; 7(10):1245-1265). Aunque la prevención de la infección por citomegalovirus, especialmente para la infección congénita se ha investigado durante mucho tiempo, no existe una vacuna con licencia en el mercado. El desarrollo de una vacuna profiláctica contra el CMVH se ha identificado como un objetivo de alta prioridad por el Institute of Medicine in the USA (www.cdc.gov/cm/overview.html, Octubre de 2011). El beneficio potencial de la inmunidad inducida por la vacuna se ha estimado en 40 veces con respecto a la transmisión intrauterina y de 25 a 30 veces con respecto a la disminución de daños en el sistema nervioso central en niños infectados congénitamente (Britt W.J. y col., Trends Microbiol. 1996; 4:34-38). Se han realizado esfuerzos durante más de 30 años para desarrollar vacunas. Sin embargo, hasta ahora no parece probable que haya ninguna licencia inminente, debido a que faltan datos de estudios clínicos o estos son incompletos. Ni los enfoques con virus vivos atenuados ni los intentos con proteínas solubles, especialmente con la vacuna de subunidades gpUL55 (gB) en combinación con o sin un adyuvante como MF59, dieron lugar a una respuesta inmunitaria de larga duración (Zhang C. y col., J. Clin. Virol 2006; 35:338-41). Se están investigando nuevos enfoques para alcanzar una mayor eficacia y comprenden candidatos basados en combinaciones de glicoproteínas, ADN y péptidos, cuerpos densos (documento WO 2008/138590) y candidatos basados en vectores virales tales como la vacuna competente para la replicación gpUL555 Alvac-gpUL555 (gB) basada en un virus de la viruela del canario (Bernstein D.I. y col., J. Infect. Dis. 2002; 185:686-90). Los primeros datos de los ensayos clínicos con la vacuna Alvac (partícula basada en la viruela del canario) en combinación con un virus vivo atenuado llevaron a una respuesta inmunitaria apropiada, mientras que los efectos duraderos están todavía bajo investigación. Las partículas similares a virus pueden acomodar propiedades similares a virus atenuados debido a su forma y, por lo tanto, son una opción prometedora para el desarrollo de vacunas, especialmente puesto que son generalmente aceptados como vehículos de vacunas excelentes. Las partículas similares a virus no se han desarrollado para el CMV hasta ahora. Sobre la base de la experiencia adquirida en los últimos 30 años para el desarrollo de una vacuna contra el CMVH, se deben cumplir los siguientes objetivos: una inducción duradera de anticuerpos neutralizantes, inducción de respuestas de células T, en especial citotóxicas, humorales y celulares, y minimización de los efectos secundarios.

20 Las razones del fracaso o la eficacia limitada de los candidatos a vacunas desarrollados hasta el momento son múltiples. Los mecanismos de inmunidad protectora en un huésped están mal dilucidados. Una de las principales razones de esto es la falta de un modelo animal apropiado para poder verificar los efectores que justifican la protección. La capacidad del virus para entrar y replicarse en diversos tipos de células, incluyendo las células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, neuronas y monocitos/macrófagos que dan lugar a diferentes patologías dificulta la determinación de efectores potentes. Debido a la complejidad del virus y a la falta de conocimiento acerca de las proteínas necesarias para la infección de tipos de células específicas, la composición de una vacuna ideal contra el CMVH es, hasta ahora, incierta.

25 El CMV es un beta-herpesvirus y pertenece al orden viral muy complejo *Herpesvirales*. El virión del CMV tiene un diámetro de ~230 nm y se compone de una nucleocápside, rodeada por una capa de tegumento menos estructurada, y limitada por una envoltura de membrana trilaminada. La molécula de ADN de doble cadena (236 kpb) lineal es el más grande entre los herpesvirus humanos y más de 50 % mayor que la del virus del herpes simple 1 (HSV-1). Además de los viriones, otros cinco tipos de partículas de virus intracelulares, envueltos y no envueltos se han recuperado de las células infectadas por CMV. El proceso de maduración del virus incluye diferentes tipos de

cápsides, cuyos cuerpos densos (CD) pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de vacunas. Los cuerpos densos (CD) son grandes (~250-600 nm) y heterogéneos. Son agregados esféricos sólidos de diferentes proteínas que contienen una proteína del tegumento (es decir pUL83) y las proteínas de superficie gpUL75 (gH) y gpUL55 (gB) (Becke S. et al, Vaccine 2010; 28: 6191-6198). Las reglas de nomenclatura uniforme para las proteínas del CMV se publicaron en Spaete R. y col., 1994, J. Gen. Virol., 75, 3287-3308: una designación alfanumérica de cada marco de lectura abierto identificado (ORF) es la base, extendida por los prefijos "p" si el estado de fosforilación de la proteína no se conoce, "pp" para fosfoproteínas y "gp" para glicoproteínas. Las designaciones con letras en minúscula se usan como sufijos para nombrar ORF adicionales que codifican proteínas. En la presente invención, las designaciones utilizadas anteriormente se indican entre paréntesis y también se indican en las tablas y figuras.

Entre las glicoproteínas estructurales del CMV, tres complejos principales (designados como GCI-gCIII) se han identificado hasta el momento. Estos complejos juegan diferentes papeles en la estructura del virus, y por lo tanto, también para el diseño de vacunas, como objetivos para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos o como herramientas de investigación. La glicoproteína B (gpUL55, GCI) como una proteína soluble sencilla no dio lugar a una respuesta inmunitaria duradera contra el CMV. Por lo tanto, deben tenerse en cuenta otras composiciones de proteínas que incluyen gpUL55 para el diseño de vacunas. El papel de gpUL100 (gM), gpUL73 (gN) y el complejo gCII formado para la generación de anticuerpos neutralizantes y como una parte esencial de una vacuna está bajo investigación. Los constituyentes de gCIII son gpUL75 (gH), gpUL115 (gL) y gpUL74 (gO) y forman un complejo heterotrimérico unido por puentes disulfuro (Huber M.T. y Compton T., J. Virol. 1999; 73(5):3886-3892). Estas proteínas desempeñan el papel más importante para la entrada del virus y la formación de complejos con otras proteínas tales como gpUL128, gpUL130 y gpUL131A. La entrada del CMV en las células epiteliales y endoteliales implica la endocitosis y la formación de complejos de gpUL75, gpUL115 y gpUL74, o de la combinación de gpUL75, gpUL115, gpUL128, gpUL130 y gpUL131 (Wang D. y Shenk T., PNAS 2005; 102:18153-18158). Además, estas proteínas son responsables de la transferencia del CMV desde las células endoteliales a los leucocitos, en representación de los principales determinantes de la difusión del CMV *in vivo*. Además, estas proteínas parecen desempeñar un papel en el cebado de las células dendríticas (CD) y, por tanto, son elementos críticos para la respuesta inmunitaria mediada por las células T. El CMV entra diferentes tipos de células por vías distintas. Para la entrada en fibroblastos se requieren complejos que contienen gpUL75/gpUL115 (gH/gL) o gpUL75/gpUL115/gpUL74 (gH/gL/gO). Esta es de una vía de infección independiente del pH, no endosómica, que podría bloquearse mediante anticuerpos neutralizantes generados después de la vacunación con una vacuna basada en la cepa Towne o adyuvante gpUL55 (gB) (MF59) (Pass R.F., J. Clin. Virol, 2009; 46 (Supl. 4), S73-76).

La segunda vía importante es un proceso de infección endosómica de células epiteliales y endoteliales que requiere el complejo pentamérico gpUL75/gpUL115/gpUL128/gpUL130/gpUL131 (gH/gL/UL128/UL130/UL131A). Esta vía de infección puede ser bloqueada por los anticuerpos neutralizantes dirigidos al complejo pentamérico (Manley K. y col., Cell Host & Microbe 2011; 10:197-209). A partir del estado actual de los conocimientos se requieren diferentes combinaciones de las proteínas anteriores para generar una vacuna eficaz que estimula una amplia respuesta inmunitaria celular y humoral. Sin embargo, la combinación exacta no se conoce. La importancia de las proteínas del complejo pentamérico se abordó recientemente en Lillier D. y col., PLoS One, Marzo 2013; 8(3): e59863, 1-13.

Las partículas similares a virus (VLP) son esferas estables, altamente organizadas que se autoensamblan a partir de antígenos estructurales derivados de virus y, por lo tanto, tienen características estructurales y antigenicidad similares al virus parental. En contraste con los virus atenuados, las VLP recombinantes son seguras y no infecciosas, ya que no contienen la ADN vírico en replicación. Por lo tanto, pueden ser generados bajo nivel de bioseguridad 1.

Hasta ahora se han usado varios vectores virales diferentes como vectores adenovirales, retrovirales, del virus de la viruela del canario, vaccinia (virus de la viruela) y vaccinia Ankara modificado (MVA) para expresar antígenos extraños para el desarrollo farmacéutico como vacunas (Wang Z. y col., J. of Virology 2004; 3965-3976; Jie Zhong y col., Plos One 2008; 3(9):e3256). La mayoría de los vectores mencionados anteriormente son competentes para la replicación, especialmente los vectores basados en retrovirus (Dalba C. y col., Mol. Ther. 2007; 15(3):457-466). No obstante, las VLP recombinantes no tienen ningún riesgo asociado con la replicación o inactivación del virus como otros tipos de vacunas. Las VLP proporcionan, sobre la base de su naturaleza particulada, una ventaja inherente sobre los antígenos solubles con respecto a la inmunogenicidad y la estabilidad. En comparación con la subunidad o las proteínas recombinantes individuales, las VLP son más inmunogénicas y son capaces de estimular respuestas inmunitarias mediadas por células B así como respuestas proliferativas de CD4 y de CTL (Ludwig C. y Wagner R., Curr. Opin. Biotechnol. 2007; 18:537-545). El tamaño de las VLP parece ser favorable para la absorción por las células dendríticas (CD) a través de endocitosis o macropinocitosis y la activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Las VLP, especialmente las VLP retrovirales (gag-VLP), contienen epítomos inmunogénicos y se supone que estimulan respuestas inmunitarias celulares a través de las vías del MHC de clase II y el MHC de clase I y (Deml L. y col., Mol. Immunol. 2005; 42:259-277). Debido a estas propiedades inmunogénicas, no parece que las VLP requieran el uso de adyuvantes para alcanzar la una estimulación inmunitaria potente. VLP se han usado ampliamente, y con bastante éxito, como vacuna (documento WO 2005/123125) y reactivos de serología vírica.

Para los virus con envoltura, las VLP requiere al menos una cápside o proteína de la matriz para el ensamblaje de una partícula vírica. Las proteínas se ensamblan en diferentes compartimentos celulares, tales como el retículo

endoplásmico (RE), las balsas de lípidos o la membrana plasmática, donde tiene lugar la gemación, y, por lo tanto, contienen los lípidos celulares que construyen la envoltura de lipoproteína vírica. Las VLP pueden también incluir proteínas de la célula huésped, por ejemplo gangliósidos asociados con las balsas lipídicas. VLP pueden explotarse para la presentación de epítomos extraños y/o moléculas de direccionamiento basado en cápsides simples o de múltiples componentes. El núcleo génico del virus de la hepatitis B fusionado con antígenos proporcionó un ejemplo temprano del enfoque de VLP (documento WO 1999/057289). Hasta la fecha no se ha generado ninguna VLP del CMV. Las VLP más grandes generados y publicadas son VLP del virus de la gripe, la lengua azul y el rotavirus, que contienen hasta 5 proteínas diferentes. No se sabe exactamente cuántas y que proteínas son necesarias para formar una partícula de CMV recombinante basada en proteínas de la cápside del CMV. Por el contrario, se sabe que muchas proteínas de la cápside que no son del virus del herpes forman VLP. El ejemplo más destacado es la proteína precursora del retrovirus gag, en particular, gag de MoMuLV (virus de la leucemia murina de Moloney), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), HTLV (virus de la leucemia de células T humana) y SIV (virus de la Inmunodeficiencia de simio). La proteína precursora pr55 del VIH forma una VLP con un tamaño de 100-120 nm y se demostró que servía como vehículo para otras proteínas. La proteína precursora gag de MoMuLV (pr65) conduce a VLP con un tamaño de 115-150 nm con un alto rendimiento basado en ensayos de inmunotransferencia y ELISA.

El sistema de vector de expresión en baculovirus (BEVS) es muy adecuado para la coinfección y coexpresión de proteínas para la producción de vacunas u otros productos biológicos, ya que su estructura del genoma y virus permite inserciones de genes extraños grandes. Es seguro debido al estrecho rango de huéspedes, restringido principalmente a las especies de lepidópteros (mariposas y polillas). El huésped de producción primaria son células de insectos, sin embargo, el baculovirus también puede aplicarse para la coexpresión recombinante en células de mamífero. El sistema de baculovirus es un sistema ampliamente utilizado y altamente eficiente para la expresión de proteínas en laboratorios de investigación y comerciales de todo el mundo (Roldao A. y col., Expert Rev. Vaccines, 2010; 9(10):1149-1176). La vacuna de VLP frente al virus del papiloma humano (VPH) de GlaxoSmithKline se produce en BEVS y está aprobada para su uso en EE.UU. y la Unión Europea (documento WO 2005/123125).

El documento WO 2010/128338 divulga vacunas contra el CMV que comprenden virus del herpes simple (VHS) o una partícula similar al virus VHS (VLP de VHS) que comprende además un poliepítomo de citomegalovirus humano (CMVH).

Sumario de la invención

La invención se refiere a una partícula similar a virus recombinante que comprenden una o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside, 3, 4, 5 proteínas diferentes de la superficie de citomegalovirus (CMV) y, opcionalmente, una o más proteínas del tegumento.

Preferiblemente, las proteínas de la cápside derivan de un virus del herpes, tal como el citomegalovirus, por ejemplo, citomegalovirus humano (CMVH), o de un retrovirus, en particular el VIH o MoMuLV. Una proteína de la cápside preferida es la proteína gag precursora de VIH y/o MoMuLV.

Las proteínas de la superficie (también denominadas proteínas de la envoltura) se seleccionan, preferiblemente, del CMVH, en particular, del grupo que consiste en gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL55 (gB), gpUL74 (gO), gp100 (gM), gp73 (gN), gpUL128, gpUL130 y gpUL131A. Asimismo, las proteínas de tegumento se seleccionan, preferiblemente, de CMVH, en particular del grupo que consiste en pUL32, pUL45, pUL47, pUL48, pUL69, pUL71, pUL72, pUL76, pUL77, pUL83 (pp65), pUL88, pUL93, pUL94, pUL95, pUL97, pUL99 y pUL103. Las proteínas del núcleo se seleccionan especialmente del grupo que consiste en pUL23, pUL24, pUL33, pUL36, pUL38, pUL43, pUL78, pUL82, pUL96, IRS1, US22 y TRS1 que tienen carácter del tegumento o de la proteína de la envoltura. Del mismo modo, las proteínas reguladoras se seleccionan preferiblemente del grupo de IE-1, UL50, UL80.5, UL46 y UL47.

La partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la invención puede comprender, además, epítomos de células B y/o T, proteínas seleccionadas del grupo que consiste en secuencias antigénicas extrañas adicionales, citocinas, motivos CpG, g-CMSF, CD19, y el ligando CD40, y/o proteínas fluorescentes, proteínas útiles para los propósitos de purificación de las partículas o para la fijación de un marcador, y/o estructuras proteicas requeridas para los procedimientos de transporte.

Además, la invención se refiere a un ADN que codifica las proteínas comprendidas en las partículas similares a virus de acuerdo con la invención, a un vector que comprende dicho ADN, en particular un vector de baculovirus, y una célula huésped que comprende un vector tal, y a procedimientos de fabricación de partículas similares a virus de acuerdo con la invención, utilizando un vector de baculovirus.

Además, la invención se refiere a una vacuna que comprende una partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la invención, en particular a una vacuna de este tipo que comprende además el complejo pentamérico que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A, y/o proteína soluble del CMV seleccionada del grupo que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL55, gpUL74, gpUL100, y gpUL73; o gpUL128, gpUL130 y gpUL131A; o pUL83, IE-1, UL99, UL91 y pp150. Tal vacuna puede comprender además un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, alumbre, AS01, AS02, AS03, AS04, MF59, MPL, QS21, ISCOMs, IC31, CpG

no metilada, ADVAX, formulaciones que contienen ARN y reactivo de Freund, pero también ADN de la invención como se ha definido anteriormente.

En una realización EN particular, la vacuna comprende proteínas deL CMV de diferentes cepas de CMV seleccionados del grupo de cepas Towne, Toledo, AD169, Merlin, TB20 y VR1814.

- 5 La vacuna que comprende una partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la invención puede mejorarse aún más en su inducción de la respuesta inmunitaria del huésped mediante una segunda inmunización con el complejo pentamérico que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL128, gpUL130, y gpUL131A en una administración de sensibilización-refuerzo y/o con una proteína soluble del CMV seleccionada del grupo que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL55, gpUL74, gpUL100, gpUL73, pUL83, y IE-1 en una administración de sensibilización-refuerzo.
- 10 Alternativamente, la vacuna que comprende una partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la invención puede mejorarse aún más en su inducción de la respuesta inmunitaria del huésped (respuesta humoral y celular) mediante la adición de los complejos solubles que consisten en al menos dos proteínas de superficie diferentes del grupo que consiste en gpUL73, gpUL74, gpUL75, gpUL100, gpUL115, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A.

Breve descripción de las figuras

15 *Figura 1: Representaciones esquemáticas de los vectores recombinantes para la expresión de diferentes variantes de partículas similares a virus CMV, ya sea basado en una cápside de herpesvirus o no herpesvirus, o para la expresión del complejo pentamérico del CMV y de proteínas solubles del CMV.*

20 Las diferentes variantes se insertan en la cadena principal del vector pRBT136 dirigido a la expresión de proteína recombinante usando el sistema de expresión de baculovirus (BEVS) y que contiene dos promotores P1 y P2 (_p10, _polh) y dos secuencias de terminación T1 y T2 (t), que son SV40 y HSVtk. Para la propagación en levaduras, los vectores contienen un origen de replicación (O), por ejemplo, 2 micrómetros, y un gen marcador (m), por ejemplo URA3. Además, los vectores contienen los sitios de transposón izquierdo (TL) y derecho (TR) para la transposición de los transgenes del vector de transferencia en bácmidos, un sitio loxP (L) para recombinación homóloga específica de sirio (fusión de plásmido), orígenes de replicación (O), genes de resistencia a la ampicilina (A), cloranfenicol (C) y gentamicina (G) y sitios de restricción definidos. Para la expresión en células de mamíferos, ya sea por transducción con un baculovirus o expresión transitoria, la estructura principal del vector pRBT 393 contiene además un promotor seleccionado de pCMV, IE1 y lef2, y un terminador seleccionado de SV40pA, BHG pA y HSVtk.

30 Abreviaturas: c: secuencia consenso; H: marcador de His; SH: marcador de estreptavidina-His; V: cepa VR1814, pcl: proteasa de precisión, pcll: proteasa de precisión y TEV, DT: herramienta de dimerización, T: terminador, O: origen de replicación, G: resistencia a la gentamicina, C: resistencia al cloranfenicol, L: Sitio loxP, TL: lado del transposón izquierdo, TR: lado del transposón derecho. Se usa nomenclatura más corta anterior CMVH (gB, gH, gL, gO así como "UL" sin prefijo y UL48 sin sufijo). Los genes están marcados solo con sus números, por ejemplo, "83" en lugar de "UL83".

35 *Figura 2: Purificación basada en gradiente de glicerol-tartrato de una variante de VLP de CMV de SEQ ID NO:7 combinada con SEQ ID NO:14.*

40 (A) Purificación basada en gradiente de glicerol-tartrato. Análisis de las diferentes fracciones de la variante de VLP de CMV –e comprende las proteínas de la cápside, funcionales, del tegumento y de la superficie UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL74(gO)-UL83-UL80.5-UL75(gH)-UL115(gL)-UL128(c)-UL130-UL131A (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO:14) de la cepa Towne mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel Bis-Tris) seguido de inmunotransferencia. Un anticuerpo de ratón anti-pUL83 (Virusys) se usó para la verificación de la proteína del tegumento. En la parte izquierda se muestra un patrón de proteína en kDa; calles 1 a 13: fracciones 1 a 13 (fraccionamiento de arriba a abajo), calle 14 control positivo.

45 (B) Verificación de los datos de inmunotransferencia mediante ensayo ELISA utilizando anticuerpos específicos contra proteínas de la cápside (UL86, UL85), el tegumento (UL83) y la superficie UL75 (gH1, gH2). La presencia de dos proteínas de la cápside, una proteína del tegumento (UL83) y una proteína de la superficie UL75 (gH) se pudo demostrar mediante unión del anticuerpo a las proteínas seleccionadas (UL86, UL85, gH2: University of Alabama, pUL83: Virusys; gH1: Santa Cruz). La presencia de baculovirus se verificó con un anticuerpo contra la proteína gp64 (eBioscience). El número 1-13 del eje x representa el número del gradiente de glicerol-tartrato de (fraccionamiento de arriba a abajo), el número 14 representa un control positivo y el número 15 un control negativo. La fuerza de la unión del anticuerpo a la proteína en las VLP se muestra como la densidad óptica (DO) en el eje y. La detección de las proteínas seleccionadas en las mismas fracciones mostró su colocalización y, por lo tanto, VLP del CMV intactas. Se obtuvieron resultados similares para la expresión y purificación de las variantes de la SEQ ID NO: 7 combinadas con las SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13.

60 *Figura 3: Purificación basada en gradiente de glicerol-tartrato de una variante de VLP de CMV de SEQ ID NO:5 combinada con SEQ ID NO:14.*

Verificación de los datos de inmunotransferencia mediante ensayo de ELISA utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de la cápside UL86 y UL85, contra la proteína del tegumento UL83 (UL83) y la proteína de la superficie UL75 (gH). La presencia de proteínas de la cápside (UL86, UL85), una proteína del tegumento (UL83)

y una proteína de la superficie UL75 (gH) se pudo demostrar mediante unión del anticuerpo a las proteínas seleccionadas UL86, UL85, gH1: anticuerpo proporcionado por la University of Alabama, UL83: Virusys; gH2: Santa Cruz). La presencia de baculovirus se verificó con un anticuerpo contra la proteína gp64 (eBioscience). El número 1-13 del eje x representa el número del gradiente de glicerol-tartrato de (fraccionado de arriba a abajo), el número 14 representa un control positivo y el número 15 un control negativo. La fuerza de la unión del anticuerpo a la proteína en las VLP se muestra como la densidad óptica (DO) en el eje y. La detección de las proteínas seleccionadas en las mismas fracciones mostró su colocalización y, por lo tanto, VLP del CMV intactas. Las VLP del CMV compuestas por las SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO: 13 condujeron a los datos casi idénticos. Para verificar la composición de las proteínas de la superficie de las VLP del CMV generadas sobre la base de la SEQ ID NO: 5 combinada con las SEQ ID NO: 9 o 10 se trataron de la manera mencionada anteriormente y mostraron valores de DO similares dentro de un intervalo de de 0,1-0,3.

Figura 4: Purificación basada en gradiente de glicerol-tartrato de una variante de VLP de CMV de SEQ ID NO:3 combinada con SEQ ID NO:18.

Verificación de los datos de inmunotransferencia mediante ensayo ELISA utilizando anticuerpos específicos contra proteínas de la cápside (UL85), el tegumento (UL83) y la superficie (UL75 (gH), UL55, gH2)). La presencia de proteínas de la cápside (UL85), una proteína del tegumento (pUL83) y una proteína de la superficie (gpUL75, gpUL55) se pudo demostrar mediante unión del anticuerpo a las proteínas seleccionadas (UL85/UL55 (gB1): University of Alabama; UL83/UL55 (gB2): Virusys; UL75 (gH): Santa Cruz). El número 1-7 del eje x representa el número de la fracción de gradiente de glicerol-tartrato 1 a 7 (fraccionado de arriba a abajo), el número 8 representa un control negativo. La fuerza de la unión del anticuerpo a la proteína en las VLP se muestra como la densidad óptica (DO) en el eje y. La detección de las proteínas seleccionadas en las mismas fracciones mostró su colocalización y, por lo tanto, VLP del CMV intactas. La misma composición intacta se observó mediante la combinación de SEQ ID NO:3 con SEQ ID NO:9, 10, 16 o 19, donde la detección del valor de DO se diferencia en un intervalo entre 0,1-0,4.

Figura 5: Purificación basada en gradiente de glicerol-tartrato de una variante de VLP de CMV de SEQ ID NO:2 combinada con SEQ ID NO:18.

Verificación de los datos de inmunotransferencia mediante ensayo ELISA utilizando anticuerpos específicos contra proteínas del tegumento (UL83) y la superficie (UL75, UL55). La presencia de una proteína del tegumento (UL83) y una proteína de la superficie (UL75, UL55) se pudo demostrar mediante la unión del anticuerpo a las proteínas seleccionadas (UL83/UL55 (gB): Virusys; UL75 (gH): Santa Cruz). La presencia de baculovirus se verificó con un anticuerpo contra la proteína gp64 (eBioscience). El número 1 del eje x representa la muestra de la prepurificación por colchón de sacarosa, calles 2-14 del eje x representa el número de las fracciones de gradiente de glicerol-tartrato de 1 a 13 (fraccionado de arriba a abajo), el número de 15 representa un control negativo para las VLP y el número 16 un control negativo para baculovirus. La fuerza de la unión del anticuerpo a la proteína en las VLP se muestra como la densidad óptica (DO) en el eje y. La detección de las proteínas seleccionadas en las mismas fracciones mostró su colocalización y, por lo tanto, VLP del CMV intactas. Las mismas proteínas que se han mencionado anteriormente se pudieron verificar, así como en las variantes de VLP del CMV compuestas por la SEQ ID NO: 2 para la cápside y tegumento y las SEQ ID NO: 9, 10, 16 o 19 para las proteínas de la superficie en un intervalo de valores de DO 0,1-0,3.

Figura 6: Purificación basada en gradiente de sacarosa de una variante de VLP de CMV de la cápside que no es de herpesvirus de SEQ ID NO:20 combinada con SEQ ID NO:14.

(A) Purificación basada en gradiente de sacarosa. Análisis de las diferentes fracciones de la variante de de VLP de CMV que comprenden la proteína gag de la cápside (precursora retroviral) y proteínas de la superficie UL75 (gH)-UL115 (gL)-UL128(c)-UL130-UL131A (SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:14) mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel de Bis-Tris) seguido de inmunotransferencia. Un anticuerpo de ratón anti-gag (DakoCytomation) se usó para la verificación de la proteína de la cápside. En la parte izquierda de la gráfica se muestra un patrón de proteína en kDa; calles 1 a 13: fracciones 1-13, calle 14: control positivo (proteína gag).

(B) Verificación de los datos de inmunotransferencia mediante ensayo ELISA utilizando anticuerpos específicos contra proteínas de la cápside (gag) y la superficie (UL75 [gH], marcadas con estreptavidina gL). La presencia de la proteína de la cápside (gag) y las proteínas de la superficie (gH, gL a través del marcador estreptavidina) pudo demostrarse mediante la unión del anticuerpo a las proteínas seleccionadas (gag: DakoCytomation; UL75 (gH): Santa Cruz, estreptavidina: AbD Serotec). Los números 1-13 del eje x representan el número de las fracciones de gradiente de sacarosa del 1 al 13 (fraccionado de arriba a abajo), el número 14 representa un control negativo para las VLP, el número 15 un control negativo para los baculovirus y el número 16 un control positivo. La fuerza de la unión del anticuerpo a la proteína en las VLP se muestra como la densidad óptica (DO) en el eje y. La detección de las proteínas seleccionadas en las mismas fracciones mostró su colocalización y, por lo tanto, VLP del CMV intactas. La misma colocalización se pudo observar por la combinación de la proteína de la cápside gag (SEQ ID NO: 20) con las proteínas del tegumento y de la superficie de las SEQ ID NO: 9, 10, 13, 15, 16 o 19. La inclusión de la SEQ ID NO: 19 mostró en general valores de DO indicativos de una mejor estabilidad de la VLP del CMV.

Figura 7: Purificación basada en gradiente de sacarosa de una variante de VLP de CMV de la cápside que no es de herpesvirus de SEQ ID NO:20 combinada con SEQ ID NO:18.

(A) Purificación basada en gradiente de sacarosa. El análisis de las diferentes fracciones de la variante de VLP del CMV que comprenden la proteína de la cápside gag (precursor de retrovirus) y las proteínas de la superficie UL75-UL115-UL128-UL130-UL131A-UL55 (SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO:18) mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel Bis-Tris) seguido de inmunotransferencia. Un anticuerpo de ratón anti-gag (DakoCytomation) se usó para la verificación de la proteína de la cápside. En la parte izquierda se muestra un patrón de proteína en kDa; las calles 1 a 13 corresponden a las fracciones 1 a 13 del fraccionamiento de arriba a abajo del gradiente y la calle 14 representa un control positivo.

(B) Verificación de los datos de inmunotransferencia mediante ensayo ELISA utilizando anticuerpos específicos contra proteínas de la cápside (gag) y proteínas de la superficie (UL75 [gH], UL55 [gB]). La presencia de la proteína de la cápside (gag) y las proteínas de la superficie (UL75 [gH], UL55 [gB]) pudo demostrarse mediante la unión del anticuerpo a las proteínas seleccionadas (gag: DakoCytomation; gB: Virusys; gH: Santa Cruz). La presencia de baculovirus se verificó con un anticuerpo contra la proteína gp64 (eBioscience). Los números 1-13 del eje x representan el número de las fracciones de gradiente de sacarosa del 1 al 13 (fraccionado de arriba a abajo), el número 14 representa la carga del gradiente y el número 15 un control positivo y el número 16 un control negativo. La fuerza de la unión del anticuerpo a la proteína en las VLP se muestra como la densidad óptica (DO) en el eje y. La detección de las proteínas seleccionadas en las mismas fracciones mostró su colocalización y, por lo tanto, VLP del CMV intactas. Una variante adicional del CMV basado en la expresión de las SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 18 condujo a resultados similares con el beneficio para apoyar la inducción de la respuesta inmunitaria celular por la proteína UL83.

Figura 8: Análisis de la variante de la VLP de CMV marcada con His/Strep SEQ ID NO: 7 combinada con la SEQ ID NO: 14 purificada mediante cromatografía de afinidad.

La variante de VLP del CMV que comprende proteínas de la cápside, funcionales, del tegumento y de la superficie UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL74-UL83-UL80.5-UL75-UL115(His/Strep)-UL128(c)-UL130-UL131A (SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:14) se purificó con un procedimiento de IMAC. El análisis de las diferentes etapas de esta purificación IMAC mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel de Bis-Tris), seguido de inmunotransferencia contra la proteína del tegumento (UL83) utilizando un anticuerpo de ratón anti-UL83 (Virusys). En la parte izquierda se muestra un patrón de proteína en kDa. Calle 1: VLP antes de la purificación (carga), calle 2: flujo continuo (FT), calle 3: lavado; calles 4 a 9: elución con cantidades crecientes de imidazol (55, 100, 150, 230, 480, 500 mM), calle 10: células de insecto (Sf9) como control negativo, calle 11: control positivo (células Sf9 infectadas). Presencia de la proteína del tegumento indicada por una flecha (UL83).

Figura 9: Análisis de la variante de la VLP de CMV basada en la cápside que no es del herpesvirus marcada con His/Strep SEQ ID NO: 20 combinada con la SEQ ID NO: 14 purificada mediante cromatografía de afinidad.

La variante de VLP del CMV que comprende proteína de la cápside gag (precursora de retrovirus) y proteínas de la superficie UL75-UL115(His/Strep)-UL128(c)-UL130-UL131A (SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:14) se purificó con un procedimiento basado en IMAC. Análisis de diferentes etapas de esta purificación por IMAC mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel de Bis-Tris) seguido de inmunotransferencia contra la proteína de la cápside (gag, Fig. 9A), utilizando un anticuerpo de ratón anti-gag (DakoCytomation) y contra la proteína de superficie marcada con estreptavidina-His UL115 (gL, Fig. 9B). En la parte izquierda se muestra un patrón de proteína en kDa, calle 1: VLP antes de la purificación (carga), calle 2: flujo continuo (FT), calle 3: lavado; calle 4 a 9: elución con cantidades crecientes de imidazol (55, 100, 150, 230, 480, 500 mM), calle 10: células de insecto (Sf9) como control negativo, calle 11: control positivo (células Sf9 infectadas). Presencia de la proteína de la cápside (gag), así como la presencia de la proteína de superficie gL marcada con estreptavidina-histidina indicada por una flecha.

Figura 10: Análisis del proceso de purificación que consiste en dos etapas de cromatografía de afinidad, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño del complejo pentamérico del CMV soluble marcada con His.

El complejo pentamérico que comprende las proteínas de superficie UL75 (marcada con His, gH)-UL115 (gL)-UL128-UL130-UL131A (SEQ ID NO: 59) se purificó mediante una cromatografía basada en afinidad (IMAC) utilizando columnas de His-Trap, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (XK16/60 Superdex200pg).

(A) La 2ª purificación IMAC se analizó mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel de Bis-Tris), seguido de tinción con coomassie. Los tamaños (kDa) del patrón proteico (calle 1) están marcados en el lado izquierdo. Calle 2: Combinación de 1ª IMAC (carga del 2º proceso IMAC), calle 3: flujo continuo, calle 4: lavado, calles 5-14 que representan fracciones de elución con una concentración creciente de imidazol de hasta 500 mM.

(B) Análisis de la purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño mediante SDS-PAGE (4-12 % de gel de Bis-Tris), seguido de tinción con coomassie. Los tamaños (kDa) del patrón proteico (calle 1) están marcados en el lado izquierdo. Calle 1: combinación de elución IV-2, precipitada; calle 2: combinación de elución IV-2, no precipitada; calle 3: combinación de elución IV-3; calle 4: combinación de elución V; calle 5: combinación de elución VI; calle 6: marcador de tamaño. Con una flecha se indican las proteínas del complejo pentamérico (gH, gL, UL128, UL130, UL131A).

(C) Inmunotransferencia usando anticuerpo contra el marcador de His de gH. La calle 1 representa la combinación de elución IV-2 (precipitado); calle 2: combinación de elución IV-2 (no precipitada); calle 3: combinación de elución IV-3; calle 4: combinación de elución V; calle 5: combinación de elución VI; calle 6: control positivo. La proteína gH marcada con His está marcada en el lado derecho.

Figura 11: Micrografía electrónica de la variante de VLP del CMVH de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 10 (A) y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 19 (B).

(A) Micrografía electrónica de VLP de CVM recombinantes que comprenden las proteínas de la cápside, funcionales, del tegumento y de la superficie UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL83-UL80.5-UL74-UL75-UL115-UL128(c)-UL130-UL131A (SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:10 mediante tinción negativa con ácido fósforo tungsteno. La barra de escala corresponde a 100 nm.

(B) Micrografía electrónica de VLP de CVM recombinantes que comprenden las proteínas de la cápside, de soporte del ensamblaje de la cápside, proteínas del tegumento y proteínas de la UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74-UL75-UL115-UL128-UL130-UL131A-UL55 (SEQ ID NO:48 y SEQ ID NO:19) mediante tinción negativa con ácido fósforo tungsteno. La barra de escala corresponde a 200 nm.

Figura 12: Micrografía electrónica de la variante de VLP del CMV no basado en herpesvirus de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 10 (A) y SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 19 (B).

(A) Micrografía electrónica de VLP de CVM recombinantes que comprenden la proteína gag de la cápside, (precursor de retrovirus) y las proteínas de la superficie UL75-UL115-UL128(c)-UL130-UL131A (SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:10) mediante tinción negativa con ácido fósforo tungsteno. La barra de escala corresponde a 100 nm.

(B) Micrografía electrónica de VLP de CVM recombinantes que comprenden la proteínas gag de la cápside, (precursor de retrovirus) de MoMULV y las proteínas de la superficie UL75-UL115-UL128-UL130-UL131A-UL55-UL83 (SEQ ID NO:88 y SEQ ID NO:19) mediante tinción negativa con ácido fósforo tungsteno. La barra de escala corresponde a 100 nm.

Figura 13: Ensayo de neutralización del virus con sueros de ratón sobre la base de estudios *in vivo* con una combinación de vacuna de la SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 18, respectivamente.

Los ratones Balb/c fueron inmunizados con un régimen de sensibilización-refuerzo-refuerzo con antígenos de CMVH. El antígeno seleccionado para este ensayo de neutralización es una mezcla de proteínas del complejo soluble (SEQ ID NO: 59) y la VLP compuesta por una cápside retroviral en combinación con la proteína del tegumento UL83 (SEQ ID NO: 22) y las proteínas del CMV UL55- UL75-UL115-UL128-UL130 y UL131A. Los sueros combinados obtenidos de ocho ratones en una dilución en serie de dos veces (de 1:20 a 1:2560) se mezclaron con una cepa recombinante del CMVH VR1814 reconstituida con BAC, que expresa EGFP bajo el promotor del CMV. Se usaron fibroblastos MRC-5 (2×10^4 células/pocillo) para evaluar la entrada de este virus en un ensayo de fluorescencia basado en células, 96 horas después del tratamiento. Las intensidades relativas de fluorescencia (IRF.%) se representan para determinadas diluciones de sueros de ratones inmunizados con una mezcla de VLP del CMV que no son herpes y el complejo pentamérico del CMV. Como control se usaron un baculovirus vacío y PBS. La inmunización con una mezcla de complejo pentamérico soluble y una VLP del CMV no basado en herpesvirus induce la generación de anticuerpos neutralizantes dentro de un intervalo de títulos de 1:160 a 1:320 comparable con los títulos de los donantes de sangre humanos utilizando la DICT₅₀ para el virus EGFP usado.

1: Sin suero, 2: 1:320, 3: 1:160, 4: 1:80. Mezcla: pentámero y VLP; BV: baculovirus.

Figura 14: Ensayo de neutralización para verificar la respuesta inmunitaria humoral basada en la SEQ ID NO: 59

Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes de donantes de sangre de CMV humanos y sueros de ratón. El suero de cinco donantes de sangre con CMVH humano positivo (grupo G2, D6-D10) y cinco negativos (grupo G1, D1-D5) donantes en una dilución en serie de dos veces (1:20 a 1:2560) se sometieron a un ensayo de fluorescencia neutralización con fluorescencia basado en células. Se muestra la dilución de suero (d.s.) que dio el mismo efecto inhibitorio que la dilución 1:320: de sueros combinados obtenidos a partir de ocho ratones previamente inmunizados con el complejo pentamérico (SEQ ID NO 59). El análisis por separado del complejo pentamérico soluble, como un componente en la mezcla de antígeno utilizado para la inmunización de ratones, mostró la inducción de anticuerpos neutralizantes en comparación con donantes de sangre humanos.

RP: pentámero preinmunitario, PO: pentámero postinmunitario, G1: donantes de sangre negativos, G2: donantes de sangre positivos.

Figura 15: Control de calidad de un componente (complejo soluble, SEQ ID NO: 59) de la vacuna candidata que contiene el complejo soluble reVLP (VLP recombinante, SEQ ID NO:22 con SEQ ID NO:18).

Las fracciones eluidas con diferentes cantidades de imidazol de muestras después de ser sometidas a una purificación basada en IMAC. Se analizó la presencia de UL75 (GH) y el marcador de His sobre gH. La similitud en la intensidad de la señal designa la integridad de gH y, por lo tanto, de todo el complejo compuesto por UL75-UL115-UL128-UL30-UL131A.

1: carga, 2: Flujo continuo, 3: lavado, 4: Imidazol 250 mM, 5-8: Imidazol 300 mM, 9-13: Imidazol 350 mM, 14: control positivo 15: control negativo.

Figura 16: Control de calidad de un componente (complejo soluble, SEQ ID NO: 59) de la vacuna candidata que contiene el complejo soluble y el reVLP (VLP recombinante, SEQ ID NO:22 con SEQ ID NO:18) usando los anticuerpos dependientes de la conformación.

Diferentes lotes de producción del complejo se analizaron un ensayo ELISA de tipo sándwich para la presencia conjunta de las proteínas designadas. Las muestras se capturaron con un anticuerpo anti-GH1 (UL75) y se

detectaron con un anticuerpos anti-gH2 y anti-His, así como anti-UL130/131A y anti-UL130 dependientes de la conformación (UL130/UL131A). Las señales confirman la coexistencia de las proteínas en un complejo, la integridad del complejo, así como la reproducibilidad de su producción.

1: lote 451-combinación 1, 2: lote 459-combinación 2, 3: lote 459-combinación 1 (EDTA 15 mM), 4: lote 459-combinación 1 (EDTA 20 mM), 5: lote 458 (EDTA 15 mM), 6: control positivo 7: control negativo 8: patrón interno.

Figura 17: Validación de una VLP de CMV no basada en herpesvirus (SEQ ID NO: 22 combinada con la SEQ ID NO: 18) ensayo ELISA de tipo sándwich.

Las diferentes fracciones de elución se analizaron para determinar la copresencia de las proteínas designadas. Las muestras se capturaron con un anticuerpo dependiente de la conformación (UL130/UL131A) dando una indicación de que las proteínas de superficie UL130 y UL131A se presentan en la conformación natural. Para la detección se usaron un anticuerpo anti-gpUL83 (pp65) y un anticuerpo anti-cápside (gag). Las señales confirman la coexistencia de proteínas en una VLP y revelan el enriquecimiento de algunas muestras en las proteínas analizadas.

1: granel, 2: fracción 7, 3: fracción 8, 4: fracción 9, 5: fracciones 8+9, 6: control negativo. nOD: DO normalizada, cap: cápside.

Figura 18: Caracterización de un procedimiento de purificación de una VLP de CMV no basada en herpesvirus (SEQ ID NO: 22 combinada con la SEQ ID NO: 18) ensayo ELISA de tipo sándwich.

Las fracciones de elución de dos matrices de cromatografía diferentes (monolito: c1 y absorbentes de membrana: C2) se analizaron para determinar la copresencia de las proteínas designadas. Las muestras se capturaron con un anticuerpo dependiente de la conformación (UL130/UL131A) y se detectaron con un anticuerpo anti-gH, un anticuerpo, un anticuerpo anti-pp65, un anticuerpo anti-gB y un anticuerpo anti-gag (cápside). Las señales confirman la coexistencia de las proteínas en una VLP y ponen de manifiesto el mejor comportamiento de la adsorción de la membrana (c2) utilizada.

1: fracción de elución de la columna 1 (c1), 2: fracción de elución de la columna 2 (c2), 3: control positivo 4: control negativo. Cap: cápside (proteína precursora gag).

Figura 19: Caracterización de una VLP del CMV basada en herpes con el ensayo ELISA de tipo sándwich.

Las VLP se produjeron con dos (figura 19A, UL86 y UL80.5, SEQ ID NO:2) o tres (Figura 19B, UL86-UL85-UL80.5, SEQ ID NO:3) diferentes proteínas de la cápside; la misma proteína del tegumento UL83 (pp65) y diferentes proteínas de la superficie (gH-gL-GB-UL128-UL130-UL131A, SEQ ID NO: 18) y fracciones de elución de la etapa de purificación subsiguiente se sometieron a ELISA de tipo sándwich. Las muestras fueron capturadas con un anticuerpo dependiente de la conformación (UL130/UL131A) contra las proteínas de la superficie y se detectaron con anticuerpos contra proteínas del tegumento y de la superficie (anti-pp65, anti-gH y anti-gB). Ambos tipos de cápside llevaron a VLP, pero con diferente rendimiento. La integración de la proteína gB parecía ser beneficiosa para el núcleo que consiste en más de tres proteínas. 1: granel, 2-10: fracciones 4-12, 11: control negativo.

Figura 20: Respuesta inmunitaria celular inducida por una combinación de una VLP del CMV no basado en herpes (SEQ ID NO: 22/SEQ ID NO: 18) y el complejo pentamérico del CMV (SEQ ID NO: 59).

Las células de bazo se reestimularon 24 horas después de la recolección con varios péptidos (1-7) y la liberación de las citocinas de tipo Th1, IFN-g (A) y la IL-2 (B), las citocinas de tipo Th2, IL -4 (C), IL-5 (D) y IL-10 (e), y las citocinas inflamatorias, GM-CSF (F) y TNFa (G) se midió con un ensayo multiplex de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Los péptidos 2-5 eran una mezcla de nonámeros con epítomos predichos (programa SYFPEITHI), mientras que los péptidos 6 y 7 fueron adquiridos comercialmente (JPT, mezcla de péptidos predefinidas). Se usaron un baculovirus vacío y PBS (simulado) como controles para la reestipulación.

1: simulado, 2: gH, 3: gB, 4: UL128/130, 5: UL131/gL, 6: pp65, 7: Gag de la cápside. Mezcla: pentámero y VLP; BV: baculovirus.

Figura 21: Análisis de VLP de CMV y componentes individuales (complejo soluble, SEQ ID NO: 59) de una vacuna utilizando sueros positivos de CMV humano.

Las VLP del CMV no basadas en herpesvirus (SEQ ID NO: 22 en combinación con la SEQ ID NO: 19), VLP de CMV basadas en el virus herpes (SEQ ID NO: 48 en combinación con la SEQ ID NO: 19) y el complejo soluble (SEQ ID NO: 59) se analizaron en un ensayo ELISA de tipo sándwich para su capacidad para reaccionar con anticuerpos humanos de donantes del CMV para simular un experimento in vivo. Las placas fueron recubiertas con anticuerpos correspondientes a diferentes proteínas del CMV (gH, gB, UL83, UL85, UL86 y basadas en la conformación UL130/UL131A), frente a Gag y a His. Las placas se incubaron adicionalmente ya sea con el complejo pentamérico soluble o VLP y posteriormente se trataron con suero humano positivo para CMV (donantes negativos para el VIH). Para la detección se usó un anti-IgG humano secundario marcado con HRP.

(A) El complejo pentamérico gH-gL-UL128-UL130-UL131A (SEQ-ID NO:59) se analizó con sueros humanos en un ensayo ELISA de tipo sándwich. gH y UL130/UL131A en el complejo son reconocidos por los anticuerpos humanos en los sueros de los donantes (mezcla de 4 sueros diferentes).. 1:complejo pentamérico; 2: control negativo (simulado); (3) control positivo (proteína que expresa His).

B) Una VLP del CMV basada en gag gag-UL83-gL-gH-UL128-UL130-UL131A-gB-UL83 (SEQ-ID NO: 22 combinado con la SEO-ID NO:19) se analizó con sueros humanos en un ensayo ELISA de tipo sándwich. La UL83 en estas VLP es reconocida por anticuerpos humanos en los sueros de los donantes. 1: VLP del CVM basado en gag; 2: control negativo (simulado). Obtuvieron resultados muy similares para una VLP del CMV basado en la cápside gag de MoMuLV (SEQ-ID NO: 88 combinada con la SEQ ID NO:19).

C) VLP del CMV basada en UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74-gL-gH-UL128-UL130-UL131A-gB-UL83: 48

combinado con la SEO-ID NO:19) se analizó con sueros humanos en un ensayo ELISA de tipo sándwich. Todas las proteínas en estas VLP fueron reconocidos por los anticuerpos humanos en los sueros de los donantes con señales muy claras para UL83, gH, UL85, UL86. 1: Gag-VLP basadas CMV 1: VLP del CVM basado en gag; 2: control negativo (simulado). Los baculovirus restantes en la fabricación del complejo de – VLP-CMV y soluble no se unen a los anticuerpos presentes en el suero en humanos

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a nuevas partículas similares a virus para su uso como vacuna contra el CMV, para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, en el tratamiento anti-CMV, como herramientas de diagnóstico y como herramientas de investigación y desarrollo. La presente invención describe varias posibilidades para generar partículas de CMV no infecciosas recombinantes que conducen a una respuesta inmunitaria humoral y celular. Se generan varias combinaciones de proteínas con el fin de obtener un producto con las propiedades deseadas. Más específicamente, la presente invención se centra en las variantes de VLP de varios componentes y combinaciones de diferentes composiciones de proteínas, tales como VLP, complejos de proteínas, proteínas solubles y/o composiciones a base de ADN, tales como vectores y péptidos.

Las VLP recombinantes de la presente invención se basan en una cápside formada por cualquiera de una combinación de proteína de la cápside CMV de 1 a 6 proteínas (cápside principal, cápside menor, proteína de la cápside más pequeña y proteínas necesarias para el ensamblaje montaje) o en una proteína precursora retroviral, en particular el de la lentiviral virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) llamado gag, y/p pr55. Otras proteínas se añaden a estas proteínas de la cápside seleccionadas a partir de proteínas del tegumento y proteínas de la superficie de CMV. La VLP formada está rodeada por una envoltura proporcionada por la célula huésped durante el proceso de secreción. Con el fin de conectar y/o incluir las proteínas del tegumento y de la superficie en su conformación natural, están presentes sus anclas de membrana individuales.

Dado que un virus CMV contiene al menos 5 proteínas de la cápside (productos génicos de UL46, UL48A, UL85, UL86, UL104), 19 proteínas reguladoras, 17 proteínas del tegumento (productos génicos de UL25, UL45, UL47, UL48, UL69, UL71, UL72, UL76, UL77, UL83, UL88, UL93, UL94, UL95, UL97, UL99, UL103), 5 proteínas de de la superficie o de la envoltura (productos génicos de UL55 [gB], UL73 [gN], U74 [gO], UL75 [gH], UL100 [gM], UL115 [gL]), los productos génicos no clasificados del marco de lectura abierto UL128, UL130, UL131A; proteínas de 15 genes específicos del virus beta-herpes (UL23, UL24, UL32, UL33, UL35, UL36, UL38, UL43, UL74 [gO], UL78, UL82, UL96, IRS1, US22, TRS1) y las denominadas proteínas funcionales de los marcos de lectura abiertos (ORF) UL50, UL80.5 conocidos hasta la fecha, teóricamente hasta 1×10^{64} combinaciones serían posibles y la VLP más grande podría contener más de 40 proteínas, con lo que las proteínas reguladoras no se tienen en cuenta. Hasta el momento no existen VLP de CMV recombinantes debido a la complejidad de este virus.

En la presente invención, se utiliza la expresión "proteína de superficie", pero es equivalente a la expresión "proteína de la envoltura".

La invención se refiere a una partícula similar a virus recombinante que comprenden una o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside, 3 proteínas diferentes de la superficie de citomegalovirus (CMV) y, opcionalmente, una o más proteínas del tegumento.

En una realización preferida de la invención, las proteínas de la superficie se seleccionan del grupo que consiste en pUL83 (pp65), gpUL75 (gH), gpUL55 (gB), gpUL100 (gM), gpUL73 (gN), gpUL74 (gO), gpUL115 (gL), gpUL75 (gH), gpUL128, gpUL130, y gpUL131A, preferiblemente de CMV humano. No obstante, se pueden usar proteínas de cepas de CMV no humano. Tales proteínas de CMV no humano pueden entonces tomar una función estructural y no inmunológica en la VLP. Las VLP recombinantes según la invención pueden comprender proteínas de otras familias de virus del herpes, tales como VHS (virus del herpes simple), EBV (virus de Epstein-Barr) y HVSK (herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi).

Para abordar la especificidad de especie, el diferente tropismo celular y la inducción de una amplia respuesta inmunitaria, las VLP de la presente invención contienen más de una proteína de la superficie en combinación con una serie de proteínas de la cápside y del tegumento.

En otra realización preferida, las VLP basadas en las proteínas de la cápside del CMV se componen de una proteína o de combinaciones de proteínas seleccionadas de las seis proteínas pUL86, pUL85, pUL48A, pUL46, pUL50, y pUL80.5, por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, o seis de estas proteínas. En un aspecto adicional de la invención, la VLP comprende la proteína pUL104.

La cápside que no es del virus de herpes se elige del *Retroviridae* de las familias retrovirales, alfa-, beta-, gamma-, delta y epsilon retrovirus, la familia lentivirus o la familia espumavirus. Fuera de la familia lentiviral, la proteína precursora gag aviar (SIV), felina (FIV), bovina (BIV) y humana (VIH) (antígenos específicos de grupo) se utiliza como la cápside para la generación de las VLP no basados en virus del herpes como así como la proteína precursora gag del retrovirus gamma, como el virus de la leucemia felina (FeLV), virus de la leucemia Moloney de ratón (Mo-MuLV), virus de la leucemia aviar (SLV) o el virus del sarcoma murino (MSV). Las VLP basadas en una cápside que no es del virus del herpes están compuestas, preferiblemente, por la proteína precursora gag del VIH

(pr55), que es una proteína precursora compuesta de una proteína de la matriz (MA, p17), de la cápside (CA, p24), de la nucleocápside (NC, p7) y una parte de enlace (LI, p6).

Se sabe que no hay grandes diferencias en el ensamblaje de las proteínas precursoras gag de diferentes miembros de la familia retroviral. Además de la gag del VIH, la variante de gag del MoMuLV, que está compuesta por las mismas subunidades, es adecuada como cápside basada en retrovirus que lleva más de tres proteínas diferentes del tegumento y/o de la superficie del CMV para la formación de una VLP de CMV, además de tener ventajas en el la fabricación y la aprobación reguladora de una vacuna. El ensamblaje de las variantes de VLP del CMV basadas en la proteína precursora gag de MoMuLV es similar al ensamblaje de las VLP basadas en gag del VIH. No hay una gran ventaja en relación con el rendimiento, mejor forma y conformación de las VLP del CMV basadas en la gaga de MoMULV. Sin embargo, en contraste con una vacuna humana de VLP de CMV basada no se esperan resultados falsos positivos en una prueba de diagnóstico para el VIH para una vacuna con VLP de CMV basado en una cápside con gag de MoMuLV.

Una VLP preferida comprende, en la parte superior de las respectivas proteínas de la cápside, una o dos proteínas de tegumento seleccionados del grupo que consiste en UL83, UL25, UL32 (pp150), y UL99, y de cinco a ocho proteínas de la superficie. Las proteínas de superficie se seleccionan, preferiblemente, del grupo que consiste en UL75 (gH), UL115, (gL), UL74 (gO), UL55 (gB), UL128, UL130, y UL131AA. En una realización adicional de la invención, la VLP también puede contener UL100 (gM) y UL73 (gN). Las proteínas de la superficie del CMV en las VLP de la invención se seleccionan junto con sus respectivos anclajes a la membrana, de tal manera que se muestran y se incluyen en su conformación natural en la estructura de la cápside recombinante.

En una realización, la cápside del CMV solo contiene la proteína de la cápside principal (UL86). En todas las demás realizaciones, la cápside consiste en más de una proteína. En la realización preferida, la VLP contiene pUL86-pUL85-pUL80.5 en combinación con proteínas del tegumento pUL83 y ppUL32 (pp150) y las proteínas de la superficie gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL55 (gB), gpUL128, gpUL130, y gpUL131A. Con la misma preferencia, las proteínas del tegumento y de superficie mencionadas se expresan en una cápside compuesta por pUL86-pUL85-pUL48A, mejorando el núcleo y, por lo tanto, la forma de la VLP.

En otra realización preferida, la VLP comprende, además, la proteína de superficie gpUL74 (gO). Esto mejora la formación de las partículas y aumenta la cantidad de las proteínas que inducen la respuesta inmunitaria protectora.

En un aspecto adicional de la presente invención, las proteínas de la cápside y del tegumento son de otro virus herpes, tal como el virus del herpes simple, el virus de Epstein-Barr, HHV-6 (Roseolovirus) o HHV-7 (*pitiriasis rosea*).

En un aspecto adicional de la presente invención, las VLP comprenden al menos una proteína del tegumento y/o una proteína de la superficie de origen de CMV no humano.

En otra realización de la presente invención, las VLP comprenden al menos dos proteínas diferentes fusionadas a un péptido que comprende un motivo en hélice superenrollada, que tiene una función de cremallera y que conecta dichas al menos dos proteínas que llevan el motivo correspondiente. Las proteínas preferidas fusionadas al péptido que comprende un motivo de hélice superenrollada son una de las proteínas de la cápside, preferiblemente UL86, y una de las proteínas de la superficie, preferiblemente a gpUL75, para soportar el ensamblaje en una VLP funcional y aumentar la cantidad de proteínas inmunogénicas en la superficie.

En una realización de la presente invención, las proteínas para la generación de una VLP recombinante de varios componentes se eligen de una sola cepa de CMV, se seleccionan, preferiblemente, de una cepa Towne, Toledo, AD169, Merlin, VR1814, y/o aislados clínicos. En otra realización, las proteínas para la generación de las VLP se seleccionan de diferentes cepas de CMV, preferiblemente de cepas Towne, Toledo, AD169, Merlin, VR1814 y/o diferentes aislados clínicos.

Las VLP que comprenden secuencias de proteínas de diferentes cepas de CMV confieren protección contra varias cepas y previenen la reinfección y/o reactivación con cepas similares. Diferentes cepas de CMV consideradas son las cepas Towne, Toledo, AD169, Merlin, TB20 y VR1814, pero también otros aislados clínicos.

Estas cepas se consideran por varias razones, tales como los datos existentes de estudios de fase clínica II de los candidatos a vacunas utilizando las cepas Towne y Toledo, datos basados en AD169 bien caracterizada y herramientas disponibles en el mercado para el análisis del proceso de fabricación. Además, el aislado clínico VR1814 contiene complejos funcionales que son importantes para la entrada en diferentes tipos de células, tales como fibroblastos y células endoteliales epiteliales. Para el cromosoma artificial bacteriano (BAC) derivado y la cepa Towne adaptada a laboratorio, se sabe que la entrada en las células epiteliales se bloquea debido a composiciones de proteínas no funcionales en la superficie. Mediante la combinación de diferentes VLP recombinantes de CMV, se eluden las averías naturales. Ahora se usan con mayor frecuencia Merlin y TB20 como cepas de referencia. Las nuevas tecnologías, tal como la secuenciación de nueva generación, permiten la determinación de epítomos inmunogénicos de donantes positivos para CMV. La información genética del virus correspondiente (aislado clínico) se utiliza para generar una vacuna mejorada. Por lo tanto, las VLP del CMV están compuestas por proteínas de diferentes cepas de virus.

Se prefieren las combinaciones Towne y VR1814 de secuencias de proteínas, en particular en una VLP compuesta por gpUL74, gpUL75, gpUL115, UL128, UL130, y UL131A, y, o bien la o las proteínas de la cápside de CMV o la proteína de la cápside gag de retrovirus.

5 Las composiciones de proteínas de la invención contienen proteínas inmunogénicas y, por lo tanto, un número de diferentes epítomos, preferiblemente del tipo que estimulan las respuestas inmunitarias humoral y celular. La activación de las respuestas inmunitarias humorales por epítomos conduce a la producción de anticuerpos que se unirán a las proteínas que contienen tales epítomos. La activación de la respuesta inmunitaria celular por epítomos conduce a la producción de células T citotóxicas (también conocidas como T_c, CTL, células T asesinas, células T citolíticas, células T CD8+, o células T asesinas) que matan las células presentadoras de tales epítomos en su superficie. Los epítomos tal como se conocen en el presente documento pueden ser repetitivos y pueden ser parte de una proteína más grande, en particular, parte de un antígeno.

Diferentes proteínas que comprenden epítomos de la invención son, por ejemplo, gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), UL128, UL130, UL131A, gpUL55 (gB), gpUL74 (gO), gpUL100 (gM), gpUL73 (gN), pUL86, pUL85, pUL80.5, pUL82, pUL83, pUL46, pUL48A, pUL50, pUL32, y la proteína temprana inmediata IE-1.

15 En una realización preferida, las VLP comprenden epítomos de una sola o de diferentes cepas de CMVH y/o cepas de CMV no humano, en combinación con epítomos de células T y/p B con el fin de inducir una respuesta inmunitaria más amplia.

20 Las VLP que comprenden una inclusión de ligandos de CD (por ejemplo, CD40L, CD19L) son otro aspecto de la presente invención. Tales VLP inducen la respuesta inmunitaria a través de una vía distinta que da lugar a una respuesta Th1 o Th2.

Un aspecto adicional de la presente invención son las VLP que comprenden motivos de CpG, citocinas, y/o beta-glucanos, tales VLP desencadenan directamente la activación de células B y mejoran y amplían la respuesta inmunitaria provocada por los epítomos específicos de CMVH.

25 En otra realización preferida, la partícula similar a virus consiste en proteínas que forman una superficie completa similar a virus, que comprende, opcionalmente, además, una proteína de la cápside del virus. La partícula similar a virus de la invención puede comprender, además, proteínas fluorescentes, proteínas útiles para los propósitos de purificación de las partículas o para la fijación de un marcador, y estructuras proteicas requeridas para los procesos de transporte.

30 La invención se refiere a una partícula similar a virus recombinante que comprende múltiples combinaciones de proteínas de la cápside, opcionalmente del tegumento y/o de la superficie de citomegalovirus no humano y/o humano en cantidades diferentes. Estas partículas contienen al menos una proteína de la cápside, preferiblemente la proteína de la cápside mayor UL86, una proteína del tegumento seleccionada del grupo de ppUL 83, ppUL32, pUL25, y la proteína IE-1, y una proteína de la superficie seleccionada del grupo que consiste en ggpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL128, gpUL130, gpUL131A, gpUL55 (gB), gpUL74 (gO), gpUL100 (gM), y gpUL73 (gN). Las proteínas de la superficie son, preferiblemente, de origen vírico humano. Las partículas similares a virus de la presente invención consisten en cualquiera de una o más, tal como de una a dieciséis proteínas que comprenden varias proteínas seleccionadas (a) de una cepa de CMVH o (b) de diferentes cepas de CMVH y/o (c) de CMV no humano, tal como de CMV de ratón o de cobaya. Se prefieren las partículas similares a virus recombinantes que comprenden uno o más, preferiblemente dos o más proteínas diferentes de una única cepa de CMVH o diferentes proteínas de diferentes cepas de CMV. Del mismo modo se prefieren las partículas similares a virus recombinantes que comprenden una o más proteínas de la cápside, las proteínas de tegumento pUL83 y ppUL32, y las proteínas de la superficie gpUL55 (gB), gpUL74 (gO) y/o las proteínas que forman una estructura pentamérica seleccionada del grupo que consiste en gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL128, gpUL130, y gpUL131A. Las partículas similares a virus recombinantes de la presente invención también pueden estar basadas en una cápside que no es del virus herpes, preferiblemente en la proteína precursora gag de lentivirus, y además estar compuestas por las proteínas de la superficie de CMV y, opcionalmente, las proteínas del tegumento de CMV.

En realizaciones preferidas, una partícula similar a virus de la invención comprende:

- a. una proteína de la cápside de una única cepa de CMV o de una cepa que no del virus herpes;
- b. una mezcla de dos o más proteínas de la cápside de una única cepa de CMV;
- 50 c. una mezcla de dos o más proteínas de la cápside de diferentes cepas de CMV;
- d. una combinación de una proteína de la cápside, una del tegumento y una de la superficie de una sola cepa CMV;
- e. una combinación de una proteína de la cápside, una del tegumento y una de la superficie de diferentes cepas de CMV;
- 55 f. una combinación de una o más proteínas de la cápside; una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una sola cepa de CMV;
- g. una combinación de una o más proteínas de la cápside; una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de diferentes cepas de CMV;

h. una combinación de una o más proteínas de la cápside; una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una o más cepas de CMV con epítomos de células T adicionales;

i. una combinación de una o más proteínas de la cápside; una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una o más cepas de CMV con exclusión de las proteínas responsables de la evasión inmune;

j. una combinación de una o más proteínas de la cápside; una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una o más cepas de CMV con exclusión de las proteínas responsables de la inhibición de la expresión del MHCI y MHCII; y

k. una combinación de una o más proteínas de la cápside, una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una o más cepas de CMV que comprende además las proteínas y/o motivos que mejoran la respuesta inmunitaria, seleccionadas del grupo de CD40L, CD19L, citocinas y motivos CpG no metilados;

l. una combinación de una o más proteínas de la cápside, una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una o más cepas de CMV con proteínas que facilitan la purificación y análisis, seleccionadas de, por ejemplo, el grupo que consiste en marcador de His, marcador de estrep., marcador de myc, marcador de Flag y marcador de Snap, y las proteínas de fluorescencia, seleccionadas de, por ejemplo, el grupo que consiste en GFP, YFP y rojo-cereza;

m. una combinación de una o más proteínas de la cápside, una o más proteínas del tegumento y una o más proteínas de la superficie de una o más cepas de CMV, que comprende además estructuras proteicas o no proteicos para acoplar productos químicos y/o nanoesferas inertes.

La estrategia presentada en la presente invención para obtener grandes y complejas VLP de CMV incluye la coexpresión de múltiples genes de vectores individuales, incluyendo genes para proteínas de la cápside, del tegumento y/o de la superficie de CMV, así como la coinfección de varios de estos vectores de coexpresión.

La producción de estas nuevas partículas similares a virus de varios componentes, complejos de proteínas y proteínas solubles se basa en la tecnología de ensamblaje recombinante (conocido como rePAX), que incluye las etapas siguientes: el ensamblaje de genes, la generación de construcciones de expresión para varios sistemas, la expresión proteica, purificación y caracterización del producto. El sistema de expresión preferido para la plataforma es el sistema de baculovirus (BEVS) o el sistema de células de mamífero. En otra realización de la presente invención se usa una combinación de ambos sistemas, conocidos como BacMam.

Las composiciones de proteínas descritas en el presente documento, tales como VLP, complejos de proteínas y proteínas individuales se generan en un tiempo más corto y en cantidades ilimitadas, debido a la utilización de herramientas específicas de ingeniería de procesos y genética. La capacidad para ensamblar los genes requeridos mediante procedimientos de biología molecular modernos, tales como la tecnología rePAX y la síntesis génica descritas, por ejemplo, permite el rápido ensamblaje del vector de ADN de codificación. El uso de estas tecnologías no requiere ninguna transferencia física del material infeccioso o carcinogénico original, potencialmente peligroso durante el desarrollo, la fabricación o la administración de partículas similares al virus, complejos de proteínas y proteínas solubles. Así, la vacuna de la invención es segura. Para la construcción de composiciones de proteínas de la invención, es suficiente el uso de secuencias de nucleótidos de CMVH disponibles en la base de datos del NCBI.

El ADN que codifica las proteínas que forman las VLP de la invención y los vectores, virales o plasmídicos, que comprende dicho ADN, son también parte de la invención.

Para la generación de construcciones de expresión para el sistema BEVS, preferentemente se usa la cadena principal del vector pRBT136, que contiene elementos para la propagación en *E. coli* y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) y para la expresión de proteínas en células de insecto.

Para la expresión en el sistema de mamífero, preferentemente se usan los elementos que contienen los pRBT393 del esqueleto del vector para el ensamblaje del gen, la recombinación homóloga y para la expresión en células de mamífero, preferentemente células HEK293, CHO, fibroblastos de prepucio humano (HFF) y células epiteliales.

El ensamblaje paralelo de los diferentes genes se lleva a cabo mediante recombinación homóloga de los productos de PCR con regiones flanqueantes homólogas y que contienen casetes de expresión (promotor-gen de interés-terminador) o genes individuales fusionados junto con los sitios de escisión de la proteasa, tal como el sitio de escisión 2A del virus la fiebre aftosa de ratón en un marco de lectura abierto (ORF). Los promotores se seleccionan, preferiblemente, del grupo que consiste en los promotores muy tardíos de baculovirus de polh, p10 y p_{XIV}, el promotor tardío de baculovirus vp39, el promotor híbrido tardío/ muy tardío de baculovirus vp39polh, los promotores tempranos de baculovirus pca/polh, *pcna*, *etl*, *p35*, *egt*, *da26*; CMV-IE1, UBC. EF-1, RSVLTR, MT, p_{DS47}, Ac5, y P_{GAL} y P_{ADH}. Los terminadores se seleccionan, preferiblemente, del grupo que consiste en SV40, HSVtk y BGH (hormona de crecimiento bovina).

La cadena principal del vector pRBT136 utilizada preferiblemente para la presente invención contiene un origen de replicación para *E. coli*, por ejemplo pBR322ori, y de levadura, por ejemplo, 2 micron ori, los promotores polh y p10 para la expresión en células de insecto, los terminadores el SV40 y HSVtk, marcadores de varias resistencias (ampicilina, gentamicina), un marcador de selección de levadura (URA3), sitios de transposones (Tn) y un sitio de

clonación múltiple (MCS).

Un casete de expresión que contiene el promotor-gen de interés-terminador se amplifica mediante PCR en el sitio en 5' con un saliente de 35 a 40 nt en el sitio en 5', y en el sitio en 3' con un saliente de 35 a 40 nt diferente adicional. Para la recombinación homóloga con un segundo casete de expresión, que tiene la misma organización, el producto de la PCR contiene, en el sitio en 5', la secuencia complementaria del saliente 35 a 40 nt del sitio en 3' del producto de la PCR anterior. Los salientes restantes en el sitio en 5' del primer producto de la PCR y el sitio en 3' del segundo producto de la PCR son homólogas a los extremos 3' y 5' de un vector linealizado (pRBT136), respectivamente. Las recombinaciones homólogas en una secuencia se llevan a cabo, a continuación, en levaduras, preferiblemente en *Saccharomyces cerevisiae*. El número de los casetes de expresión/productos de PCR para ensamblar en paralelo con la estrategia descrita antes se incrementa de acuerdo con el número necesario de genes que se van a ensamblar. Por este medio, se ensamblan múltiples genes/casetes de expresión en paralelo. Los genes ensamblados están flanqueados por los sitios de transposones. Estos se utilizan para la transposición de los genes en el genoma de baculovirus. El vector de coexpresión de baculovirus resultante se asegura de que los genes se coexpresan de la misma célula individual. El rendimiento y la composición de los productos varían en función del número de proteínas y los parámetros de producción. Los parámetros de producción, tales como la línea celular, el recuento de células en la infección (CCI), la cantidad de inóculo de virus recombinante (multiplicidad de infección, MOI) y el momento de la recolección (TOH) se determinan con respecto al rendimiento y la recolección temprana utilizando un sistema de matriz y una producción a pequeña escala (2-20 ml; Ries, C., John C., Eibl R. (2011), A new scale down approach for the rapid development of Sf21/BEVS based processes - a case study. En Eibl R., Eibl D. (Editores): Single-use technology in Biopharmaceutical Manufacture, 207-213, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey). A continuación, los parámetros definidos se utilizan para producir el producto en cuestión a mayor escala. Las partículas de la invención se fabrican utilizando técnicas de cultivo tisular desechables modernas que permiten la alta capacidad de producción.

Las líneas celulares de producción preferidas de la presente invención son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9, Sf21, Hi-5, Vankyrin (VE-1, VE-2, VE-3), Express Sf+ y S2 Schneider. Para la expresión en células de mamífero, en particular células humanas, se usan, por ejemplo, células HEK293, CHO, HeLa, Huh7, HepG2, BHK, MT-2, fibroblastos de prepucio humano (HFF), fibroblastos de médula ósea, células neurales primarias, o células epiteliales. Para la expresión en levaduras se usan *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*, o *P. pastoris*.

El cultivo y la propagación de células huésped de acuerdo con la invención se llevan a cabo en cualquier recipiente, biorreactor o unidad desechable que proporciona las condiciones adecuadas para la célula huésped particular.

Las partículas de CMV descritas en el presente documento se purifican mediante ultracentrifugación basada en gradientes de glicerol-tartrato y sacarosa o técnicas modernas basadas en cromatografía, preferiblemente cromatografía de afinidad (IMAC) y cromatografía de intercambio iónico utilizando grandes matrices porosas, tales como membranas adsorbentes y monolitos.

Las partículas similares a virus de la invención se utilizan como agentes terapéuticos y/o vacunas profilácticas. Además se utilizan como antígenos en las herramientas de diagnóstico y como antígenos para la generación de anticuerpos.

Para ambos tipos de vacunas, profilácticas o terapéuticas, la respuesta de células T citotóxicas CD8+ específica de antígeno, así como la respuesta de células T colaboradoras CD4+ específicas de antígeno, es más importante. Por lo tanto, las composiciones proteicas de las VLP están adaptadas para inducir células T mediante la expresión de, por ejemplo, pUL83, un estimulante de células T conocido. Con el fin de seguir haciendo frente a las diferentes necesidades de las vacunas preventivas, la presente invención contiene combinaciones de VLP, complejo de proteína soluble y proteínas individuales. Las composiciones de las VLP están adaptadas para contener glicoproteínas inmunogénicas (gpUL75, gpUL55) y las proteínas necesarias para la formación de complejos distintos (gpUL115, gpUL128, gpUL130, gpUL131A). Estas combinaciones comprenden la combinación de complejo pentamérico soluble [gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL128, gpUL130, gpUL131A] y partículas similares a virus, la combinación de una o más proteínas solubles únicas (tales como pUL83, gpUL55) y las partículas similares a virus, y la combinación de las partículas similares a virus, el complejo pentamérico y una proteína soluble sola. Las combinaciones están dirigidas a la mejora de la respuesta inmunitaria en general e inducen la generación de anticuerpos neutralizantes y una respuesta de larga duración. Para la inducción de anticuerpos neutralizantes, las glicoproteínas gpUL75 (gH), gpUL115 (GL) y gpUL55 (gB) son objetivos esenciales y, por tanto, se expresan en la superficie de las VLP del CMV, preferentemente de las VLP del CMVH.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de VLP de CMV y complejo pentamérico soluble gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL128, gpUL130, gpUL131A) en un régimen de sensibilización-refuerzo, preferentemente sensibilizando con las VLP y reforzando con el complejo pentamérico. La sensibilización con el complejo pentamérico y el refuerzo con VLP es un esquema de vacunación adecuado. La combinación de VLP y proteína soluble y/o VLP y ADN en tal escenario de sensibilización-refuerzo es otro aspecto de la presente invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una vacuna que comprende una partícula similar a virus recombinante como se ha descrito, en particular a una vacuna de este tipo adicional que comprende además el

complejo pentamérico que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A, y/o proteína soluble del CMV seleccionada del grupo que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL55, gpUL74, gpUL100, y gpUL73; o gpUL128, gpUL130 y gpUL131A; o pUL83, IE-1, UL99, UL91 y pp150. Tal vacuna puede comprender además un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, alumbre, AS01, AS02, AS03, AS04, MF59, MPL, QS21, ISCOMs, IC31, CpG no metilada, ADVAX, formulaciones que contienen ARN y reactivo de Freund, pero también ADN de la invención como se ha definido anteriormente.

Para reducir la probabilidad de enfermedad congénita, es deseable una vacuna profiláctica para prevenir la primera infección por CMV de la madre, mientras que se necesita una terapia eficaz en el caso de que a una madre se le diagnostique una infección activa por CMV.

Las composiciones farmacéuticas de las VLP de la presente invención se utilizan en un procedimiento de profilaxis. Un procedimiento para vacunar a un ser humano utiliza una composición farmacéutica de la presente invención que comprende las VLP en el intervalo de 10 µg a 10 mg/dosis. Se supone un ser humano promedio de 70 kg para recibir al menos una sola vacunación. Preferiblemente, se elige un régimen de dosificación que comprende 3 dosis aplicadas a 0, 8 y 24 semanas, seguido opcionalmente de una segunda ronda de vacunación 12-24 meses después de la última inmunización. Las vías preferidas de administración preferidas son administración subcutánea (sc) e intramuscular (im), pero la intradérmica y la intranasal también son administraciones adecuadas.

Asimismo, se usan las composiciones farmacéuticas de las VLP de la presente invención en un procedimiento de tratamiento terapéutico. Un procedimiento para vacunar a un ser humano con fines de tratamiento utiliza una composición farmacéutica de la presente invención que comprende las VLP en el intervalo de 10 µg a 10 mg/dosis. Se supone un ser humano promedio de 70 kg para recibir al menos una sola vacunación. Preferiblemente, se elige un régimen de dosificación que comprende 3 dosis aplicadas a 0, 8 y 24 semanas, seguido opcionalmente de una segunda ronda de vacunación 12-24 meses después de la última inmunización. La composición farmacéutica de la presente invención comprende VLP en el intervalo de 5 µg a 10 mg/dosis para las mujeres y la mitad de esta dosis para los niños.

En un aspecto adicional de tratamiento, las composiciones farmacéuticas comprenden VLP, complejo pentamérico, y/o proteína soluble en forma de composiciones farmacéuticas separadas o combinadas para un régimen de sensibilización-refuerzo. Cada componente se utiliza en el intervalo de 10 µg a 10 mg/dosis, respectivamente. La composición farmacéutica de la combinación de VLP y complejo pentamérico y/o proteína soluble está en el intervalo de 10 µg a 10 mg/dosis de cada componente. También son posibles diferentes proporciones de los componentes. Se supone un ser humano promedio de 70 kg para recibir al menos una sola vacunación. Preferiblemente, se elige un régimen de dosificación que comprende 3 dosis aplicadas a 0, 8 y 24 semanas, seguido opcionalmente de una segunda ronda de vacunación 12-24 meses después de la última inmunización. Las vías preferidas de administración preferidas son administración subcutánea (sc) e intramuscular (im), pero la intradérmica y la intranasal también son administraciones adecuadas.

El procedimiento de tratamiento de la invención es particularmente importante para receptores de trasplante de órganos sólidos, médula ósea y células madre. Para estos pacientes, una rápida y eficaz respuesta de células T CD8+ y CD4+ es crucial. Para hacer frente a este tema, la composición farmacéutica de la presente invención está en el intervalo de 10 µg a 10 mg/dosis. Se supone un ser humano promedio de 70 kg para recibir al menos una vez una vacunación. Preferiblemente, se elige un régimen de dosificación que comprende 3 dosis aplicadas a 0, 2 y 4 semanas antes del trasplante, seguido opcionalmente de una segunda ronda de vacunación 1, 4, 8 meses después del trasplante.

Las vacunas de acuerdo con la invención comprenden la partícula recombinante similar a virus, el complejo pentamérico y/o la proteína soluble en solución acuosa, y, opcionalmente además, compuestos reguladores de la viscosidad, compuestos estabilizantes y/o un adyuvante que aumenta la inmunogenicidad, como se conoce en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de vectores de expresión recombinante RBT136-7 y RBT136-9

Para la generación de construcciones de expresión para el sistema BEVS, se usa la cadena principal del vector pRBT136, que contiene elementos para la propagación en *E. coli* y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) y para la expresión de proteínas en células de insecto. Para las diversas variantes de VLP se eligieron diferentes genes para proporcionar las proteínas de la cápside, del tegumento y de la superficie.

Los genes se generan mediante síntesis génica con una optimización específica para *Spodoptera frugiperda* y se eligen de los siguientes grupos de los genes de citomegalovirus: primero desde el compartimiento de la cápside, por ejemplo pUL86, pUL85, pUL46, pUL48, pUL50, y pUL80.5 (UL80A); segundo desde la parte tegumento, por ejemplo pUL83, pUL25, ppUL32, y pUL99, y tercero desde la parte de la superficie, por ejemplo gpUL55 (gB), gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL74 (gO), gpUL100 (gM), gpUL73 (gN), gpUL128, gpUL130 y gpUL131A. Con el fin de construir la cápside de CMVH se usaron combinaciones de varios genes de pUL86, pUL85, pUL46, y pUL80a, opcionalmente en combinación con los genes funcionales pUL48a y pUL50. El tegumento elegido es pUL83,

mientras que la superficie se preparó a partir de gpUL55 (gB), gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL74 (gO), gpUL128, gpUL130 y gpUL131A.

El ensamblaje paralelo de pUL86-pUL85-pUL50-pUL48-pUL46-pUL83-pUL80.5-gpUL74 (gO) en un vector de expresión, así como el ensamblaje de gpUL75 (gH)-gpUL115 (gL)-gpUL128-gpUL130-gpUL131A en un segundo vector de expresión se llevó a cabo mediante recombinación homóloga de productos de PCR que representan diversos casetes de expresión del tipo de promotor-gen-terminador. La cadena principal del vector pRBT136 contiene un origen de replicación para *E. coli* y de levadura, los promotores polh y p10 para la expresión en células de insecto, el terminador SV40 y HSVtk, marcadores de varias resistencias (ampicilina, gentamicina), un marcador de selección de levadura (URA3), sitios de transposones (Tn) y un sitio de clonación múltiple (MCS). El casete de expresión que contiene el promotor-UL86-terminador se amplificó por PCR en el sitio en 5' con el cebador RBT155 (TGATTTGATAATAATTCTTATTTAAC, SEQ ID NO:63) y en el sitio en 3' con un saliente de 35-40 nt (GGCTAGCTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATACATCTAGA, SEQ ID NO:64). Para la recombinación homóloga con el casete de expresión que contiene el promotor UL85-terminador, esta parte se amplificó por PCR en el extremo N-terminal con la secuencia complementaria del saliente de 35-40 nt en el extremo C-terminal del producto de PCR anterior. La recombinación homóloga se llevó a cabo en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*): Un cultivo de una noche se centrifugó a 500 xg, a 25 °C durante 5 minutos, el sobrenadante se aspiró y el sedimento se lavó con agua y con tampón Tris-EDTA-LiOAc. El vector, linealizado con EcoRI y HindIII (1 µl), ADN de esperma de salmón (8 µl) y los productos de PCR (1-4 µl) que representa los casetes de expresión se añadieron a 50 µl de levadura se lavaron, se incubaron durante 30 minutos a 30 °C, seguido de un choque térmico a 42 °C y se sembraron en una placa de agar con los respectivos aminoácidos sin uracilo, y se incubaron durante 3 días. El vector resultante se aisló de la célula de levadura por congelación (nitrógeno líquido, 2 min) -descongelación (95 °C, 1 min) -lisis. Después de la adición del mismo volumen de cloroformo, el vector se precipitó con el doble de volumen de etanol. Vector de precipitado (5 µl) se añadió a 50 µl de XL-1 blue competente (Stratagene), seguido de una transformación de acuerdo con el protocolo del fabricante: incubación en hielo durante 30 minutos, seguido de un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, un choque de frío de 2 minutos a 4 °C, adición de 200 µl de medio 2YT, y una incubación de 1 hora a 220 rpm a 37 °C. A continuación, el cultivo se sembró en placas de agar 2YT que contenían 100 µg de ampicilina y 100 µg de gentamicina. Los clones crecidos se verificaron mediante cribado por PCR, digestiones de análisis y secuenciación para probar la presencia de todos los genes ensamblados.

Los genes UL83 y UL80.5 se ensamblaron en los vectores pRBT4 y se combinaron mediante recombinación cre-lox con pRBT136 que contenía pUL86-pUL85-pUL50-pUL48-pUL46-gpUL74 (GO). Se añadió 1 µl de cre-recombinasa a 500 ng de pRBT5 y pRBT136 en un volumen total de 10 µl y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de una inactivación por calor de 10 minutos a 70 °C se realizó una transformación en células XL-1 blue competentes como se ha descrito anteriormente. Los clones se verificaron mediante cribado por PCR, digestión analítica y secuenciación. Los plásmidos secuenciados se usaron para la generación del genoma del baculovirus correspondiente (bácmido). Los genes de interés se transfirieron mediante recombinación homóloga específica de sitio a través de transposición dirigida por Tn7 en células DH10MB competentes. Se añadieron 10 ng de plásmido secuenciado a 100 µl de células DH10MB competentes y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Después de un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, un choque de frío de 2 minutos a 4 °C, adición de 400 µl de medio 2YT y una incubación de 4 horas a 37 °C a 220 rpm, se sembró una dilución de 1:10 en placas de agar 2YT adecuadas que contenían los antibióticos de acuerdo con los marcadores de resistencia e IPTG/X-gal para la selección azul-blanco. Se seleccionaron los clones correctos, se expandieron y el ADN se aisló utilizando el procedimiento de Birnboim y Doly (Nucleic Acids Res. 1979; 7(6):1513-23). Se seleccionaron cuatro clones de bácmido correctos (1 µg de cada uno) para la transfección inicial de células de insecto (Sf9, 1×10^6 células/6 pocillos) utilizando el reactivo Fugene (3 µl, Roche, Suiza) para generar el virus de la semilla recombinante (V_0). Se realizaron dos amplificaciones consecutivas de este virus utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05 ufp/célula en un cultivo de 200 ml para la generación de virus de siembra maestra (V_1) y virus de siembra de trabajo (V_2). El título infeccioso del virus de siembra de trabajo se determinó mediante un ensayo en placa clásico. Se añadieron diluciones del virus (10^5 a 10^8 en un volumen de 1 ml) a 1×10^6 células/6 pocillos de cultivo de células Sf9, y se incubaron durante 1 hora a 27 °C. Después de la aspiración del virus, las células se cubrieron con 4 % de agarosa en medio Sf900-1.3, seguido de una incubación a 27 °C en una cámara humidificada. El título infeccioso de las diferentes construcciones estaba en el intervalo de $1-5 \times 10^7$ ufp/célula.

Los parámetros de producción, tal como la línea celular, el número de células en la infección (CCI), la cantidad de inóculo de virus recombinante (multiplicidad de infección, MOI) y el momento de la recolección (TOH) se determinaron en biorreactores de 50 ml (Cultiflask, Sartorius Stedim) mediante infección de un cultivo de células de insecto de 20 ml. Se realizó una matriz de diferentes CCI (0,5; 1, 2 $\times 10^6$ células/ml), MOI (0,1, 0,4, 1, 2, 4) y el momento de la recolección (TOH) durante 7 días para determinar los mejores parámetros de producción con respecto al rendimiento (Ries, C., John C., Eibl R. (2011). A new scale down approach for the rapid development of Sf21/BEVS based processes - a case study. en Eibl R., Eibl D. (Editors): Single-use technology in Biopharmaceutical Manufacture, 207-213, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey). La producción se controló por muestreo diario, determinando el recuento de células y la viabilidad. Las muestras se analizaron mediante inmunotransferencia y ELISA. Los mejores parámetros de producción con respecto al rendimiento evaluados como la intensidad más alta (transferencia de puntos) y la DO más alta (ELISA) se alcanzaron 3 días después de la infección (p.i.) con un recuento de células de la infección (CCI) de 2×10^6 células/ml y una MOI de 0,2 de cada virus utilizado para la

coinfección.

5 Para la inmunotransferencia, 100 µl de las muestras de cultivo de células se sometieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) mediante filtración utilizando una cámara de transferencia de puntos (BioRad). Después de bloquear los sitios de unión no específica durante 30 minutos con una solución de 5 % de leche seca desgrasada TrisCl-Tween20 (0,1%), la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con anticuerpos contra la proteína del tegumento UL83. La detección de proteínas se realizó con una solución de NBT/BCIP (ThermoFisher) después de la incubación con un anticuerpo anti-ratón secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Cell signaling).

10 Para el ensayo ELISA se diluyeron todas las muestras de cultivo de células recogidas 1:10 en tampón de recubrimiento 100 µl/pocillo (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9) en una placa de ELISA de 96 pocillos de preabsorción (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, la placa se lavó 3 veces con tampón de 195 µl/pocillo (1 × PBS, 0,05 % de Tween 20), seguido de un bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente con 195 µl/pocillo de BSA al 3% en solución 1 × PBS. Después de 3 etapas de lavado, se añadieron los anticuerpos específicos a una concentración de 1 µg/ml en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, a pH 7 (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usó un anticuerpo anti-gH de ratón (Santa Cruz) para la detección de la proteína de la superficie gH, mientras que la proteína del tegumento UL83 se verificó con un anticuerpo anti-UL83 de ratón (Virusys) Después de 3 etapas de lavado se realizó una 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario apropiado (anti-IgG-HRP de ratón, dilución 1: 1.000 en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, pH 7). La unión de los anticuerpos específicos (UL83, gH) a la VLP se detectó usando 100 µl/pocillo de reactivo de sustrato TMP (BD Biosciences, San Diego, EE.UU., de acuerdo con el protocolo del fabricante), a partir de entonces, se detuvo la reacción después de 3 a 15 minutos con 100 µl de HCl 1, seguido de la medición de la DO a 450 nm en un lector de microplacas.

Los siguientes vectores de expresión (pRBT136-x) para la generación de variantes de VLP del CMV se procesaron como se describe en el Ejemplo 1.

25 Abreviaturas: c: secuencia consenso; H: marcador de His; SH: marcador de estreptavidina-His; V: VR1814, pcl: proteasa de precisión, pcll: proteasa de precisión y TEV, DT: herramienta de dimerización. Para la descripción de los genes en la Tabla 1 se usa nomenclatura más corta anterior CMVH (gB, gH, gL, gO así como "UL" sin prefijo y UL48 sin sufijo).

Tabla 1

Variante del vector (pRBT 136-x) SEQ ID	Genes contenidos	Variante con herramienta de dimerización (DT) en gH y la proteína de la cápside (gag o UL86)
1	UL86, Towne	
2	UL86-UL83-UL80.5, Towne	
3	UL86-UL85-UL83-UL80.5, Towne	
4	UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46, Towne	
5	UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL83-UL80.5, Towne	
6	U L86-U L85-U L50-U L48A-U L46-U L74, Towne	
7	UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL74-UL83-UL80.5, Towne	
8	gB, Towne	
9	gH-gL-UL128-UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
10	gH-gL-UL128(c)-UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
11	gH-gL(H)-UL128-UL130-UL131A, Towne	
12	gH-gL(H)-UL128(c)-UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
13	gH-gL(SH)-UL128-UL130-UL131A, Towne	
14	gH-gL(SH)-UL128(c)-UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
15	gH-gL-UL128(Towne)-UL130(V)-UL131A(V)	
16	gH-gL-UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)	
17	gL-UL128-UL130-UL131A-gB, Towne	
18	gL-UL128-UL130-UL131A-gB-gH, Towne	gH (DT; Towne)
19	gL-UL128-UL130-UL131A-gB-gH-UL83, Towne	
20	Gag	

ES 2 608 637 T3

(continuación)

Variante del vector (pRBT 136-x) SEQ ID	Genes contenidos	Variante con herramienta de dimerización (DT) en gH y la proteína de la cápside (gag o UL86)
21	Gag-herramienta de dimerización (DT)	
22	Gag-UL83	
23	gH(DT)-gL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
24	gH (DT)-gL-UL128(c)-UL130-UL131A, Towne	
25	gH(DT)-gL(SH)-UL128-UL130-UL131A, Towne	
26	gH (DT)-gL(SH)-UL128(c)-UL130-UL131A, Towne	
27	gL-UL128-UL130-UL131A-gB-gH(DT), Towne	
28	gL-UL128-UL130-UL131A-gB-gH-gag, Towne	gH (DT; Towne), gag (DT)
29	gL-UL128(c)-UL130-UL131A-gB(T)-gH (T)-gag	gH (DT), gag (DT)
30	gL-UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)-gB(T)-gH(T)-gag	gH (DT), gag (DT)
31	gL-UL128-UL130-UL131A-gB-gH-gag-UL83, Towne	
32	gL-UL128(c)-UL130-UL131A-gB-gH-gag-UL83, Towne	
33	gL-UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)-gB(T)-gH(T)-gag-UL83(T)	
34	gag-UL83, Towne	gag (DT)
35	UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL83-UL80.5, Towne	UL86 (DT)
36	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
37	UL128 (c)-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
38	UL128 (c)-UL130(V)-UL131A(V)- gL-gB-gH-UL86-UL85, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
39	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL80.5, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
40	UL128(c)-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL80.5, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
41	UL128 (c)-UL130(V)-UL131A(V)- gL-gB-gH-UL86-UL80.5, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
42	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL80.5-UL83-UL85, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
43	UL128 (c)-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL80.5-UL83-UL85, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
44	UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)-gL-gB-gH-UL86-UL80.5-UL83-UL85, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
45	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL80.5-UL83-UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
46	UL128(c) -UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL83-UL80.5-UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
47	UL128(c) -UL130(V)-UL131A(V)- gL-gB-gH-UL83-UL80.5-UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
48	UL74-UL86-UL83-UL80.5-UL85, Towne	UL86 (DT)
49	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
50	UL128(c) -UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74, Towne	gH (DT), UL86 (DT)

ES 2 608 637 T3

(continuación)

Variante del vector (pRBT 136-x) SEQ ID	Genes contenidos	Variante con herramienta de dimerización (DT) en gH y la proteína de la cápside (gag o UL86)
51	UL128(c) -UL130(V)-UL131A(V)- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
52	UL74-UL86-UL85-UL50-UL48A-UL46-UL83-UL80.5, Towne	UL86 (DT)
53	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
54	UL128(c) -UL130-UL131A- gL-gB-gH- UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
55	UL128(c)-UL130(V)-UL131 A(V)-gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL74-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
56	UL128-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83- - UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
57	UL128(c)-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83--UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
58	UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)- gL-gB- gH-UL86-UL85-UL83-UL50-UL48A-UL46, Towne	gH (DT), UL86 (DT)
59	gH (sin anclaje a la membrana, His)-gL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
60	gH (sin anclaje a la membrana, SH)-gL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
61	gH (sin anclaje a la membrana, H-pcl)-gL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
62	gH (sin anclaje a la membrana, H- pcli)-gL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
67	UL86-UL85	UL86 (DT)
68	UL73-UL86-UL80.5-UL83-UL85, Towne	UL86 (DT)
69	UL86-UL80.5-UL83-UL85-UL73, Towne	UL86 (DT)
70	UL100-UL86-UL80.5-UL83-UL85, Towne	UL86 (DT)
71	UL86-UL80.5-UL83-UL85-UL100, Towne	UL86 (DT)
72	UL100-UL73, Towne	
73	UL100-UL73-UL86-UL80.5-UL83-UL85-, Towne	UL86 (DT)
74	UL86-UL83-UL80.5-UL85-UL100-UL73, Towne	UL86 (DT)
75	UL74-UL86-UL83-UL80.5-UL85-UL73, Towne	UL86 (DT)
76	UL74-UL86-UL83-UL80.5-UL85-UL100, Towne	UL86 (DT)
77	UL74-UL86-UL83-UL80.5-UL85-UL100-UL73, Towne	UL86 (DT)
78	U L86-U L85-U L48A	UL86 (DT)
79	UL86-UL85-UL48A-UL100	UL86 (DT)
80	UL86-UL85-UL48A-UL83	UL86 (DT)
81	UL86-UL85-UL48A-UL83-UL100	UL86 (DT)
82	UL86-UL85-UL48A-UL83-UL100-UL73	UL86 (DT)
83	UL74-UL86-UL85-UL48A-UL83-UL100	UL86 (DT)
84	UL74-UL86-UL85-UL48A-UL83-UL100-UL73	UL86 (DT)
85	UL128-UL130-UL131 A-gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL50-UL48A-UL46, Towne	UL86 (DT)
86	UL128(c)-UL130-UL131A- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL50-UL48A-UL46, Towne	UL86 (DT)

(continuación)

Variante del vector (pRBT 136-x) SEQ ID	Genes contenidos	Variante con herramienta de dimerización (DT) en gH y la proteína de la cápside (gag o UL86)
87	UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)- gL-gB-gH-UL86-UL85-UL83-UL80.5-UL50-UL48A-UL46, Towne	UL86 (DT)
88	MoMULV gag	DT
89	MoMULVgag-UL83	DT
90	UL74-UL86-UL85-UL48A-UL83-UL-100gL-UL128-UL130-UL131A-gB-gH, Towne	UL86(DT), gH(DT)
91	UL86-UL85-UL48A-UL83-UL100-gL-UL128(c)-UL130(V)-UL131A(V)-gB-gH, Towne	UL86(DT), gH(DT)

Ejemplo 2: Vectores de expresión pRBT136CMV-1; pRBT136CMV-8 y pRBT136CMV-20

5 Para obtener los vectores de expresión pRBT136CMV-1; pRBT136CMV-8 y pRBT136CMV-20, cada gen de interés, a saber UL86, UL55 (gB), y gag, se subclonó a partir de un vector pBluescript mediante digestión y unión con BamHI (5') y HindIII (3') en la cadena principal pRBT136 cortado con las mismas enzimas. La ligación se llevó a cabo con 2 µg de pRBT136 cortado, fragmento de 10 µg y 1 µl de T4-ligasa (NEB) en un volumen total de 20 µl, seguido de una transformación en células XL-1 blue competentes como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Construcción de expresión para la variante de la cápside pRBTCMV-2

10 Para obtener la construcción de expresión para la variante de la cápside pRBTCMV-2 para la generación de VLP del CMV, un casete de expresión que contiene UL86 y otro con UL83 se ensamblaron en paralelo como se describe en el Ejemplo 1. La integración del casete de expresión de UL80.5 se realizó mediante ligación de un producto de PCR utilizando como cebador directo RBT204 (TGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTATCATAACCCCGGAATATTAATA GATCATGG, SEQ ID NO: 65) y un cebador inverso RBT189 (GTAGCGTCGTAAGCTA ATACG, SEQ ID NO: 66) mediante ligación tal como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 4: Construcción de expresión para la variante de la cápside pRBTCMV-3

20 Para generar la construcción de expresión para la variante de la cápside de pRBTCMV-3, el plásmido de la variante pRBTCMV-2 se cortó con la enzima de restricción AvrII. El casete de expresión con el gen UL85 se amplificó con los cebadores pRBT526 (5') y pRBT189 (3') y se introdujo en el plásmido pRBTCMV-2 mediante recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 5: Expresión, purificación y caracterización de la variante 5 VLP de CMV

25 De acuerdo con los parámetros de expresión proteica definidos después de la optimización sistemática (Ejemplo 1) se producen partículas similares a virus (VLP) que comprenden UL86-UL85-UL50-UL48-UL46-UL83-UL80.5-UL74-GH-GL-UL128-UL130-UL131A en matraces de agitación desechables de 1 l (volumen del cultivo 300 ml) en células del gusano soldado *Spodoptera frugiperda* (Sf9) mediante coinfección de 2 baculovirus (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 12) que contienen cada uno de múltiples genes. Los parámetros de producción fueron los siguientes: recuento inicial de células en la infección (CCI) de 2×10^6 células/ml, una multiplicidad de infección (MOI) de 0,4 ufp/ml, para cada virus 0,2 ufp/ml, incubación a 27 °C. a 100 rpm. La recolección se realizó el día 3 después de la infección (p.i.) a una viabilidad de aproximadamente el 80 %. La producción se controló por muestreo diario, determinando el recuento de células y la viabilidad. El sobrenadante que contenía VLP se concentró 3x utilizando filtración de flujo tangencial con un casete Hydrosart Sartoco Slice200 con un corte de peso molecular (MWCO) de 100 kDa y un área de filtro de 0,02 m² (Sartorius Stedim) a una caudal de 80 ml/min y una presión transmembrana de entre 1 a 1,5 bares. La fracción retenida se sometió a purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de glicerol-tartrato de 2 etapas. En una primera etapa, 25 ml de la fracción retenida se cubrieron sobre un colchón de 6 ml de sacarosa al 30 % (p/v en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) y se sedimentaron durante 1,5 horas a 16.000 rpm y 16 °C usando un rotor SW28. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml de tampón TN-(Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). Se preparó un gradiente de glicerol-tartrato de (30 % de glicerol mezclado con 15-35 % de tartrato, 12 ml de volumen), superpuesto con los 0,5 ml de material prepurificado y se centrifugaron durante 16 horas a 24.000 rpm y 16 °C usando un rotor SW41. El gradiente se fraccionó desde la parte superior en fracciones de 0,9 ml y las VLP purificadas se analizaron mediante procedimientos bioquímicos. 150 µl de diferentes fracciones del gradiente se cargaron en un gel de 4-12 % de Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, se pasó durante 15 minutos a 150 V y durante 45 minutos a 180 V utilizando tampón de carrera MOPS. Los geles se tñeron durante la noche con el reactivo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) y se destiñeron con agua.

Para inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a 19 V durante 1 hora usando un aparato semi-seco (BioRad). Después de bloquear los sitios de unión no específica durante 30 minutos con una solución de 5 % de leche seca desgrasada TrisCl-Tween20 (0,1%), la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con anticuerpos contra las proteínas específicas, tal como la proteína del tegumento pUL83. La detección de proteínas se realizó con una solución de NBT/BCIP (ThermoFisher) después de la incubación con un anticuerpo anti-ratón secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Cell signaling).

La proteína total se determina mediante un ensayo de Bradford adaptado a un formato de placa de 96 pocillos (BCA, Pierce). 20 µl de la muestra desconocida o estándar se diluyeron en 180 µl de tampón. Se realizan diluciones en serie de 2 veces para el patrón por triplicado (seroalbúmina de suero bovino pura) o muestras desconocidas. Se añadieron 100 µl de 2x reactivo de reserva de Bradford (Pierce) por pocillo. A continuación, se mezcla la placa y la absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas de microtitulación. Las VLP del CMV contenidas en las diferentes fracciones obtenidas por fraccionamiento del gradiente de glicerol-tartrato se analizan más mediante la investigación de la unión de un anticuerpo específico contra la proteína del tegumento UL83 (anti-UL83 de ratón, Virusys) y la proteína de la superficie gH (anti- gH de ratón. Santa Cruz). Por tanto, las diferentes fracciones de gradiente se diluyeron a 1:10 en tampón de recubrimiento 100 µl/pocillo (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9) en una placa de ELISA de 96 pocillos de preabsorción (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, la placa se lavó 3 veces con tampón de 195 µl/pocillo (1 × PBS, 0,05 % de Tween 20), seguido de un bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente con 195 µl/pocillo de BSA al 3% en solución 1 x PBS. Después de 3 etapas de lavado, el anticuerpo específico, se añadió el anticuerpo anti-superficie (anti-GH.), así como el anticuerpo anti-tegumento (anti-UL83) en una concentración de 1 µg/ml en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % Tween 20%, pH 7 (100 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de otras 3 etapas de lavado. Para la detección, se realizó una 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario apropiado (anti-IgG-HRP de ratón, dilución 1: 1.000 en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, pH 7). La unión del anticuerpo específico a la VLP se detectó usando 100 µl/pocillo de reactivo de sustrato TMP (BD Biosciences, San Diego, EE.UU., de acuerdo con el protocolo del fabricante), a partir de entonces, se detuvo la reacción después de 3 a 15 minutos con 100 µl de HCl 1, seguido de la medición de la DO a 450 nm en un lector de microplacas.

La siguiente Tabla 2 es una visión general de las variantes de VLP del CMV que se expresaron, se purificaron y caracterizaron como se describe en el Ejemplo 5. Se controló la calidad de las construcciones genéticas descritas en la Tabla 1 mediante secuenciación antes de que se utilizaran para su posterior manipulación, tales como la generación de los baculovirus correspondientes. La calidad de la integridad de los baculovirus generados se controla mediante control del transgén basado en la PCR para determinar la presencia de cada gen individual. Las propiedades más importantes para la fabricación y la aprobación ruldota, tal como el rendimiento y la colocalización de las proteínas, especialmente de las proteínas de la superficie inmunogénicas de estas VLP del CMV se indican en la Tabla 2.

Tabla 2

VLP fabricadas	Cápside	tegumento	superficie	propiedades
1	86, towne	-	gB-gH-gL-128-130-131, towne	Cantidad baja de VLP
2	86-85-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-128-130-131, towne	Cantidad baja de VLP
3	86-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-128-130-131, towne	Cantidad baja de VLP
4	86-85-50-48-46-80.5, towne	83, towne	gH-gL-128-130-131, towne	Buena colocalización
5	86-85-50-48-46-80.5, towne	83, towne	gO-gH-gL-128-130-131, towne	buena colocalización
6	86-85-50-48-46-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-130-131 towne; secuencia consenso 128	buena colocalización
7	86-85-50-48-46-80.5, towne	83, towne	gO-gB-gH-gL-130-131 towne; secuencia consenso 128	buena colocalización
8	86-85-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-130-131 towne; secuencia consenso 128	buena colocalización

(continuación)

VLP fabricadas	Cápside	tegumento	superficie	propiedades
9	86-85-80.5, towne	83, towne	gO-gB-gH-gL-130-131 towne; secuencia consenso 128	buena colocalización
10	86-85-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-128 towne, 130-131 Cepa VR1814	Cantidad media de VLP
11	86-85-80.5, towne	83, towne	gO-gB-gH-gL-128 towne, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
12	86-85-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-towne, consenso 128, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
13	86-85-80.5, towne	83, towne	gO-gB-gH-gL-towne, consenso 128, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
14	86-85-80.5, towne	83, towne	gB-gH-gL-128 towne, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
15	86-80.5, towne	83, towne	gO-gB-gH-gL-128 towne, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
16	86-80.5, towne		gB-gH-gL-towne, consenso 128, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
17	86-80.5, towne		gO-gB-gH-gL-towne, consenso 128, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
18	gag	-	gH-gL-128-130-131, towne	buena colocalización
19	gag	-	gB-gH-gL-128-130-131, towne	buena colocalización
20	gag	83, towne	gB-gH-gL-128-130-131, towne	Muy buena colocalización
21	gag	-	gB-gH-gL-128 towne, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
22	gag	-	gO-gB-gH-gL-128 towne, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
23	gag	-	gB-gH-gL-towne, consenso 128, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización
24	gag	-	gO-gB-gH-gL-towne, consenso 128, 130-131 Cepa VR1814	buena colocalización

Ejemplo 6: Expresión, purificación y caracterización del complejo pentamérico de CMV

5 De acuerdo con los parámetros de expresión de proteínas definidos en base a la optimización sistemática (Ejemplo 1 para la VLP), el complejo pentamérico de CMV que comprende gpUL75 (gH-His)-gpUL115 (gL)-gpUL128-gpUL130-gpUL131A se produce en 2 matraces de agitación desechables de 2l (volumen del cultivo 700 ml) en células del gusano soldado *Spodoptera frugiperda* (Sf9) mediante la coexpresión de un solo baculovirus (SEQ ID NO: 59). Los parámetros de producción fueron los siguientes: recuento inicial de células en la infección (CCI) de 2×10^6 células/ml, una multiplicidad de infección (MOI) de 0,25 ufp/ml, incubación a 27 °C. a 100 rpm. La recolección se realizó el día 3 después de la infección (p.i.) a una viabilidad de aproximadamente el 80 %. La producción se controló por muestreo diario, determinando el recuento de células y la viabilidad. El sobrenadante que contenía el complejo se cargó en 2 columnas de 5 ml de Histrap (GE Healthcare). El complejo se purificó usando un gradiente lineal de cero a 500 mM de imidazol sobre 50 volúmenes de columna (CV, equivalente a 500 ml. Las diferentes fracciones cromatográficas se analizaron mediante procedimientos bioquímicos. 150 µl de diferentes fracciones se precipitaron con acetona, se resuspendieron en 30 µl de Tris 20 mM, tampón NaCl 150 mM, pH 7,4. Para cargar en un gel de Bis-Tris NuPAGE 4-12 % (Invitrogen) se añadió 4 × de colorante de carga de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido de electroforesis durante 15 minutos a 150 V y durante 45 minutos a 180 V usando tampón de

carrera MOPS. Los geles se tiñeron durante la noche con el reactivo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) y se destiñeron con agua. para la concentración y la purificación adicional de una 2ª cromatografía de IMAC se realizó utilizando un 1 ml de la columna HisTrap mediante una gradiente lineal sobre 50 volúmenes de columna de imidazol 0-500 mM. Las diferentes fracciones se analizaron como la 1ª etapa de IMAC mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-His. Todas las fracciones que contenían el complejo se agruparon, se concentraron hasta un volumen final de de 5 ml usando un valor de corte 50 kDa en una unidad de filtro Amicon (Millipore) y se cargaron para una etapa de purificación final en una columna de exclusión por tamaño (XK16/69, Superdex200pg) y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti –His. La proteína total se determina mediante un ensayo de Bradford adaptado a un formato de placa de 96 pocillos (BCA, Pierce). 20 µl de la muestra desconocida o estándar se diluyeron en 180 µl de tampón. Se realizan diluciones en serie de 2 veces para el patrón por triplicado (seroalbúmina de suero bovino pura) o muestras desconocidas. Se añadieron 100 µl de 2x reactivo de reserva de Bradford (Pierce) por pocillo. A continuación, se mezcla la placa y la absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas de microtitulación. El complejo pentamérico de CMV contenido en las diferentes fracciones de la purificación cromatográfica se analiza adicionalmente mediante la investigación de la unión de un anticuerpo específico contra el marcador de His añadido a gpUL75 (gH, anti-His de ratón, AbD Serotec) y la propia gpUL75 (gH, anti-gH de ratón, Santa Cruz). Por tanto, las diferentes muestras se diluyeron a 1:10 en tampón de recubrimiento 100 µl/pocillo (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9) en una placa de ELISA de 96 pocillos de preabsorción (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, la placa se lavó 3 veces con tampón de 195 µl/pocillo (1 × PBS, 0,05 % de Tween 20), seguido de un bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente con 195 µl/pocillo de BSA al 3% en solución 1 × PBS. Después de 3 etapas de lavado, el anticuerpo específico, se añadieron el anticuerpo anti-His (anti-His), así como el anticuerpo anti-gpUL75 (anti-gH) a una concentración de 1 µg/ml en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % Tween 20%, pH 7 (100 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de otras 3 etapas de lavado. Para la detección, se realizó una 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario apropiado (anti-IgG-HRP de ratón, dilución 1: 1.000 en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, pH 7). La unión del anticuerpo específico al complejo pentamérico se detectó usando 100 µl/pocillo de reactivo de sustrato TMP (BD Biosciences, San Diego, EE.UU., de acuerdo con el protocolo del fabricante), a partir de entonces, se detuvo la reacción después de 3 a 15 minutos con 100 µl de HCl 1, seguido de la medición de la DO a 450 nm en un lector de microplacas.

Ejemplo 7: Verificación visual de ensamblajes generados mediante microscopia electrónica

Para verificar la forma de las VLP purificadas se realizó microscopia electrónica. Una gota de 10 µl de la muestra de VLP se incubó 10 minutos sobre una rejilla EM de cobre cubierto, se tiñó con 5 µl de ácido de fósforo de tungsteno durante 5-10 minutos y se eliminó la tinción 2 veces con agua durante 1 minuto. El líquido en la rejilla se eliminó con un papel Whatman y la red se transfirió al microscopio JEOL3000, se investigó y se realizaron imágenes de las partículas tomadas.

Ejemplo 8: Ensayos de unión mediante el uso de ELISA de tipo sándwich

Se realizó un ELISA de tipo sándwich para determinar la presencia y accesibilidad de las proteínas de superficie de diferentes reVLP (VLP recombinantes). Por tanto, se añadió un anticuerpo específico de la superficie y/o del tegumento a una concentración de 1 µg/ml en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, a pH 7 (100 µl/pocillo) en tampón de recubrimiento (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9) en una placa de ELISA de 96 pocillos de preabsorción (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, la placa se lavó 3 veces con tampón de 195 µl/pocillo (1 × PBS, 0,05 % de Tween 20), seguido de un bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente con 195 µl/pocillo de BSA al 3% en solución 1 × PBS. Después de 3 etapas de lavado, se añadieron las diferentes VLP en una dilución de 1:10 en 3 de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, a pH 7 (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 etapas de lavado, el anticuerpo específico, se añadió el anticuerpo anti-superficie (anti-GH), así como el anticuerpo anti-tegumento (anti-UL83) en una concentración de 1 µg/ml en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % Tween 20%, pH 7 (100 µl/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de otras 3 etapas de lavado. Para la detección, se realizó una 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario apropiado (anti-IgG-HRP de ratón, dilución 1: 1.000 en 3 % de BSA, 1 × PBS, 0,05 % de Tween 20, pH 7). La unión del anticuerpo específico a la VLP se detectó usando 100 µl/pocillo de reactivo sustrato TMP (BD Biosciences, San Diego, EE.UU., de acuerdo con el protocolo del fabricante). La reacción se detuvo después de 3-15 minutos con 100 µl de HCl 1M, seguido de la medición de la DO a 450 nm en un lector de microplacas.

Ejemplo 9: Estudio *in vivo* en ratones

Para el estudio *in vivo* se utilizaron ratones Balb/C en un régimen de sensibilización-refuerzo-refuerzo. Cada grupo contenía 8 ratones y cada ratón recibió 20 µg de proteína por inyección. Para la combinación (CMV-reVLP + complejo pentamérico) se inyectó una cantidad total de 40 µg de proteína. Se extrajeron los sueros preinmunes después de 14 días de cuarentena de los ratones (día 0). La primera inyección se llevó a cabo 10 días después, seguido de una inyección de refuerzo el día 42. La primera extracción se llevó a cabo el día 49. La 2ª inyección de refuerzo se realizó el día 61, seguido de na extracción adicional el día 70. La extracción final se llevó a cabo el día 85, seguido de la investigación de la respuesta inmunitaria humoral y celular.

60

Ejemplo 10: Respuesta inmunitaria humoral basada en el ensayo de neutralización

La respuesta inmunitaria humoral del candidato a vacuna basada en la combinación de un CMV-reVLP (VRBT-20) y el complejo pentamérico (SEQ ID: 59) se investigó mediante un ensayo de neutralización de los sueros de ratones del ejemplo 9 en comparación con sueros de donantes de sangre humana negativos para CMV y positivos para CMV. Una cepa VR1814 reconstituida con BAC (cromosoma artificial bacteriano) portadora de una molécula de GFP por razones de análisis (fix-EGFP) se utilizó para la infección de fibroblastos (MRC-5) y células epiteliales (ARPE-19) para visualizar el potencial de neutralización de los sueros de ratón del Ejemplo 9. Se sembraron 2×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio RPMI que contiene 10 % de FCS (suero bovino fetal).

Se generó una acumulación de suero de los 8 ratones se y se añadió en diluciones en serie de 2 veces (1:20 a 1:2560) en 100 μ l/pocillo de medio RPMI/FCS. El virus fix-EGFP VR1814 mencionado anteriormente se añadió a una dosis infecciosa de cultivo tisular (DICT) de 1000 moléculas de virus/pocillo que se determinó en un preensayo. Las placas de 96 pocillos se incubaron durante 8 días a 37 °C en una atmósfera controlada de CO₂. La determinación de células verde se realizó en un lector de placas con los siguientes parámetros: fluoresceína-filtro [excitación 485/20, emisión 530/25), modo de lectura del fondo, tiempo: 0,1 segundos, 25 \times mediciones/pocillo después de 96 horas de incubación. La potencia de la neutralización se determinó como la dilución de los sueros capaces de mostrar una inhibición de la infección por el virus del 50%. Se realizaron los siguientes controles: control celular (células + PBS), control de virus (solo las células infectadas) y 5 sueros positivos para CMV positiva y 5 sueros negativos para CMV de donantes de sangre humanos.

Ejemplo 11: Respuesta inmunitaria celular sobre la base de datos EliSpot (Ensayo Multiplex)

El día 85 del estudio *in vivo* (Ejemplo 9) se sacrificó a los ratones y se prepararon los esplenocitos preparados para el análisis de 10 citocinas diferentes. Para la reestimulación de los esplenocitos se utilizaron el CMV-reVLP, así como mezclas de péptidos sintéticos. Las siguientes proteínas se verificaron: HIVgag, pUL83, gpUL75, gpUL115, gpUL55, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A. Una predicción de epítipo de cada proteína se realizó utilizando varios algoritmos bioinformáticos. Para cada proteína se generó una mezcla de 4 péptidos para la reestimulación de los esplenocitos. Para HIVgag se utilizó una mezcla de péptidos disponible en el comercio de 130 péptidos (JPT, Berlín). Se investigaron las citocinas (IFN-gamma, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, gCMSF y TNF) mediante un kit de ensayo multiplex de Invitrogen de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 12: Ensayos de unión basados en la reacción de los anticuerpos presentes en el suero de sangre positiva para CMV

Para caracterizar las diferentes VLP de CMV y los complejos solubles como parte de una vacuna se realizó un doble ensayo de unión en un formato ELISA de tipo sándwich. La presencia y la accesibilidad de las proteínas de la cápside, el tegumento y la superficie de diferentes reVLP se investigó mediante una combinación de anticuerpos monoclonales purificados y anticuerpos presentes en una mezcla de sueros de donantes de sangre positivos para CMVH. Por tanto, los anticuerpos monoclonales anti-CMV, tales como anti-gH, anti-gB, anti-UL83, anti-UL86, anti-UL85, anti-UL130/UL131A, anti-gag, anti-His, se diluyeron a una concentración final de 1 μ g/ml de tampón de recubrimiento (Na₂HPO₄ 0,1 0,1 M, pH 9) en una placa de ELISA de preabsorción de 96 pocillos (100 μ l/pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después la placa se lavó 3 veces con 195 l/pocillo de tampón de lavado (1 \times PBS, 0,05% de Tween 20), seguido de un bloqueo 1 h a temperatura ambiente con 195 l/pocillo de BSA al 3% en 1 \times solución PBS. Después de 3 etapas de lavado, se añadieron las diferentes VLP de CMV y el complejo soluble en una dilución de 1:10 en 3 de BSA, 1 \times PBS, 0,05 % de Tween 20, a pH 7 (100 μ l/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 etapas de lavado se añadió una mezcla de 4 sueros humanos positivos para CMV en una dilución de 1:300 en 3 % de BSA, 1 \times PBS, 0,05 % de Tween 20, pH 7 (100 μ l/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente seguida de otras 3 etapas de lavado. Para la detección, se realizó una 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario apropiado (anti-IgG-HRP humana, dilución 1: 1.000 en 3 % de BSA, 1 \times PBS, 0,05 % de Tween 20, pH 7). La unión de los anticuerpos presentes en el suero humano a las proteínas que componen las VLP y el complejo soluble se detectó usando 100 μ l/pocillo de reactivo sustrato TMP (BD Biosciences, San Diego, EE.UU., de acuerdo con el protocolo del fabricante). La reacción se detuvo después de 3-15 minutos con 100 μ l de HCl 1M, seguido de la medición de la DO a 450 nm en un lector de microplacas. Este tipo de ensayo sándwich fue elegido para verificar la integridad de las VLP de CMV y el complejo soluble basado en la unión a, por un lado, los anticuerpos monoclonales y, por el otro lado, a los anticuerpos presentes en los sueros positivos para CMV. La unión a los anticuerpos humanos en los sueros mostró la accesibilidad de las proteínas de la VLP del CMV y el complejo soluble.

Ejemplo 13: Caracterización de diferentes reVLP de CMV y el complejo soluble utilizando suero sanguíneo de donantes positivos para CMV

Las diferentes variantes de reVLP del CMV se produjeron como se describe en el Ejemplo 5 y se sometieron a concentración por una ultracentrifugación basada en colchón de sacarosa. 25 ml del sobrenadante del cultivo se cubrieron sobre un colchón de 6 ml de sacarosa al 30 % (p/v en Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) y se sedimentaron durante 1,5 horas a 20.000 rpm y 16 °C usando un rotor SW28. El sedimento se resuspendió en 0,2-0,4 ml de tampón TN-(Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). 50 μ l del sedimento resuspendido se cargaron en un gel

ES 2 608 637 T3

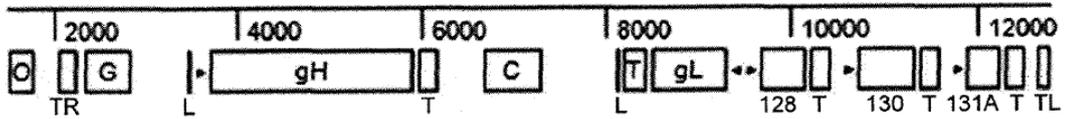
de 4-12 % de Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, se pasó durante 15 minutos a 150 V y durante 60 minutos a 180 V utilizando tampón de carrera MOPS. Los geles se tiñeron durante la noche con el reactivo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) y se destiñeron con agua.

- 5 Para inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a 19 V durante 1 hora usando un aparato semi-seco (BioRad). Después de bloquear los sitios de unión no específica durante 30 minutos con una solución de 5 % de leche en polvo desgrasada TrisCl-Tween 20 (0,1%), la membrana se incubó durante la noche a 4 °C con cualquiera de los sueros de los ratones (combinación de 8 ratones por grupo) o de los donantes de sangre humanos mencionados en el Ejemplo 10 en una dilución de 1:500 con 5 % de leche en polvo desgrasada TrisCl-Tween20 (0,1%).
- 10 La detección de proteínas se realizó con una solución de NBT/BCIP (ThermoFisher) después de la incubación con un anticuerpo anti-ratón secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Cell signaling).

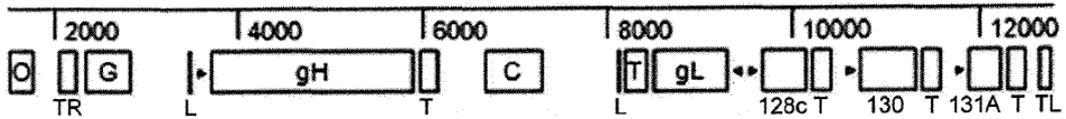
REIVINDICACIONES

1. Una partícula similar a virus recombinante que comprende una o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside, 3 o más proteínas de la superficie de citomegalovirus (CMV) y, opcionalmente, una o más proteínas del tegumento.
- 5 2. La partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside, 5 o más proteínas de la superficie de citomegalovirus (CMV) y, opcionalmente, una o más proteínas del tegumento.
3. La partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende (i) una o más proteínas de la cápside de un virus herpes, y una o más proteínas del tegumento de citomegalovirus humano (CMVH); o
- 10 (ii) una o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside de un retrovirus; o
(iii) una o más proteínas de la cápside de un virus herpes, 3 o más proteínas de la superficie de citomegalovirus humano (CMVH) y, opcionalmente, una o más proteínas del tegumento de citomegalovirus humano (CMVH).
4. La partícula similar a virus recombinante de acuerdo con la reivindicación 3 (i), en la que el virus herpes es citomegalovirus humano CMVH.
- 15 5. La partícula similar a virus recombinante de acuerdo con reivindicación 3 (ii), en la que la una o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside de un retrovirus es gag.
6. La partícula similar al virus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las proteínas de la superficie de citomegalovirus se seleccionan del grupo que consiste en gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL55 (gB), gpUL74 (gO), gpUL100 (gM), gpUL73 (gN), gpUL128, gpUL130 y gpUL131A
- 20 7. La partícula similar al virus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las proteínas del tegumento se seleccionan del grupo que consiste en pUL83 y pUL32.
8. Un ADN que codifica las proteínas comprendidas en una partícula similar a virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 9. Un vector que comprende ADN de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un vector baculovirus de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.
12. Una vacuna que comprende una partícula similar a virus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 13. La vacuna de la reivindicación 12, que comprende además el complejo pentamérico que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A; o una proteína de CMV soluble seleccionada del grupo que consiste en gpUL75, gpUL115, gpUL55, gpUL74, gpUL100, gpUL73, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A.
14. La vacuna de la reivindicación 12 o 13, que comprende además una proteína de CMV soluble seleccionada del grupo que consiste en pUL83, IE-1, pUL99, pUL91, pUL82 y pp150.
- 35 15. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende proteínas de CMV de diferentes cepas de CMV seleccionadas del grupo de las cepas Towne, Toledo, AD169, Merlin, TB20 y VR1814.

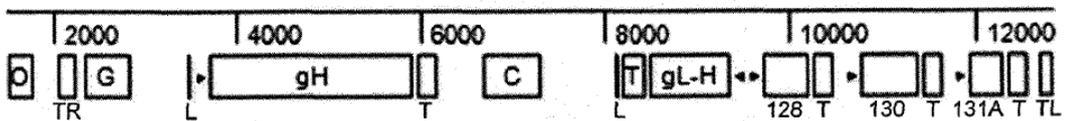
SEQ ID NO:9



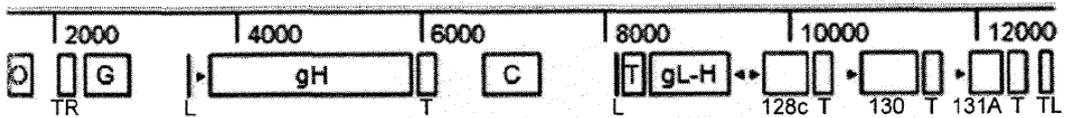
SEQ ID NO:10



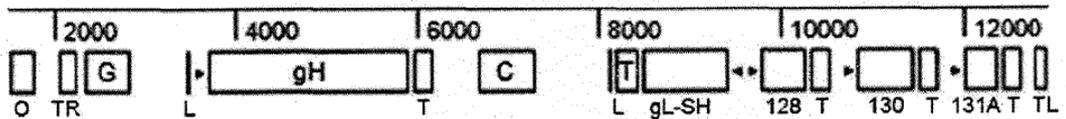
SEQ ID NO:11



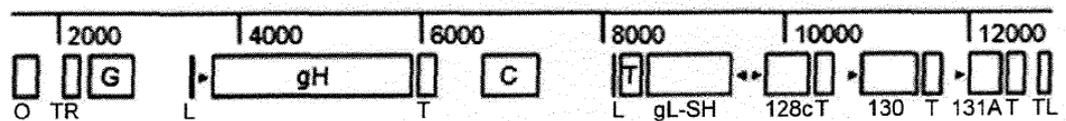
SEQ ID NO:12



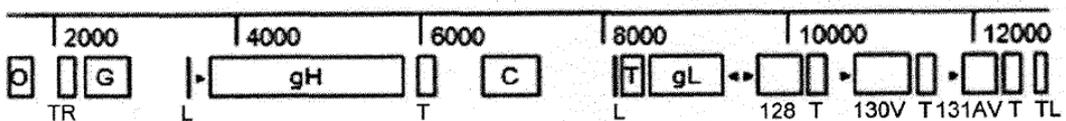
SEQ ID NO:13



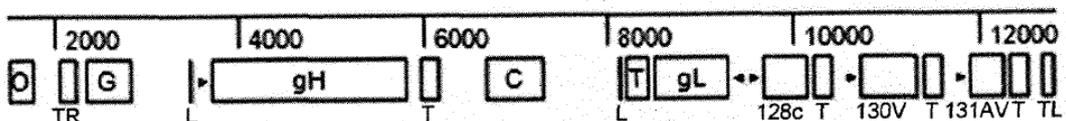
SEQ ID NO:14



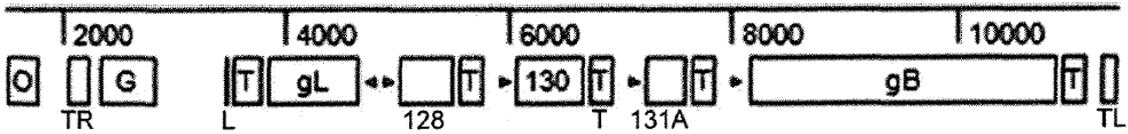
SEQ ID NO:15



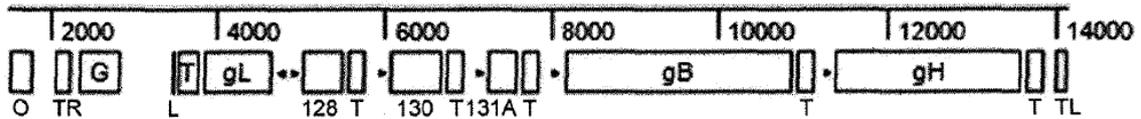
SEQ ID NO:16



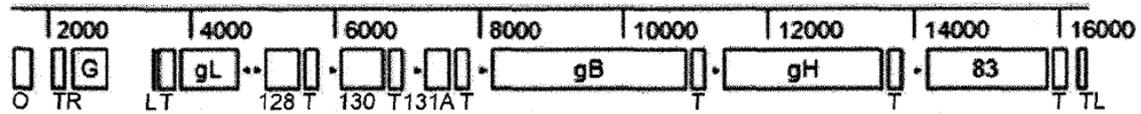
SEQ ID NO:17



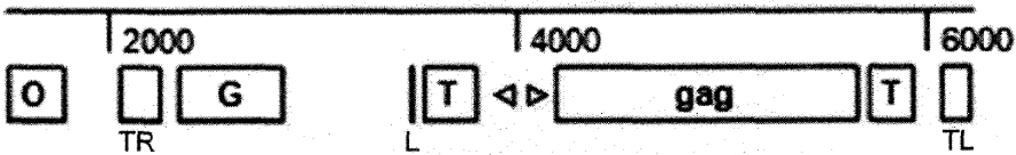
SEQ ID NO:18



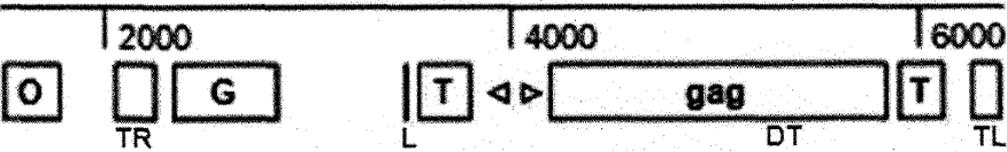
SEQ ID NO:19



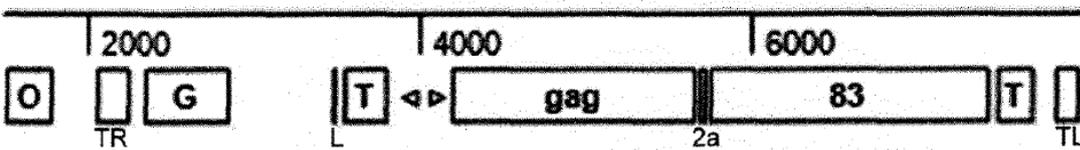
SEQ ID NO:20



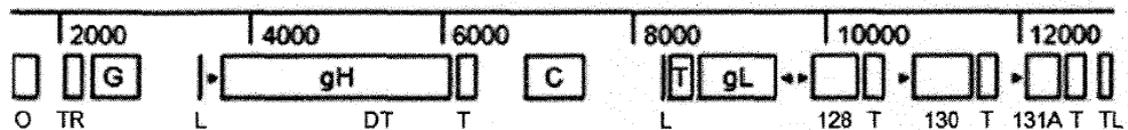
SEQ ID NO:21



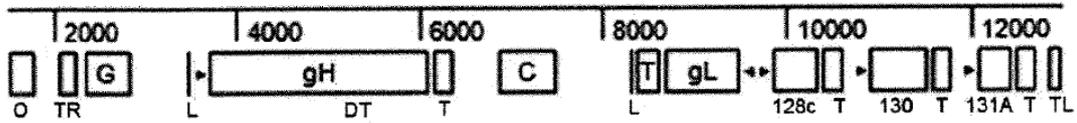
SEQ ID NO:22



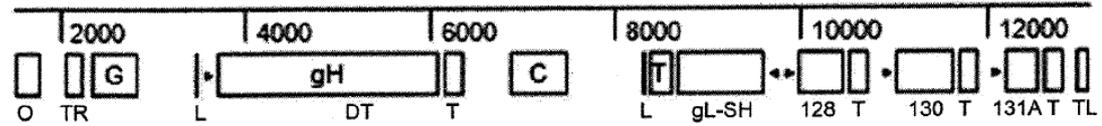
SEQ ID NO:23



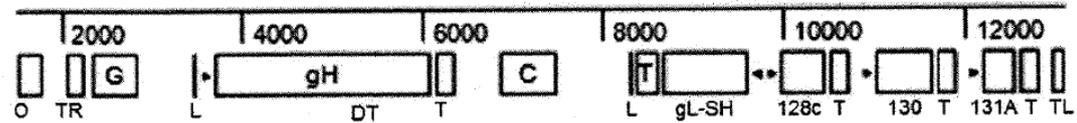
SEQ ID NO:24



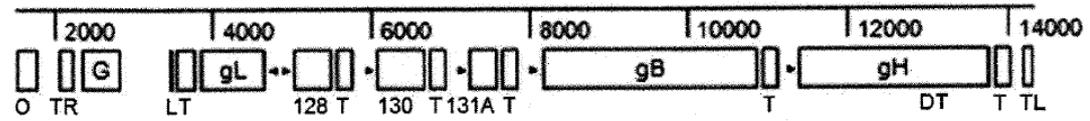
SEQ ID No:25



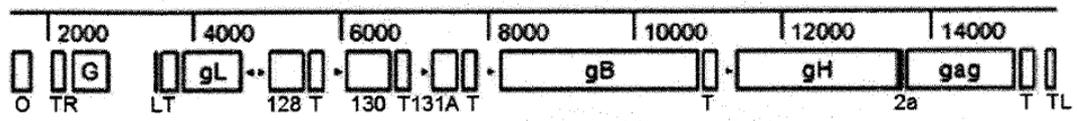
SEQ ID NO:26



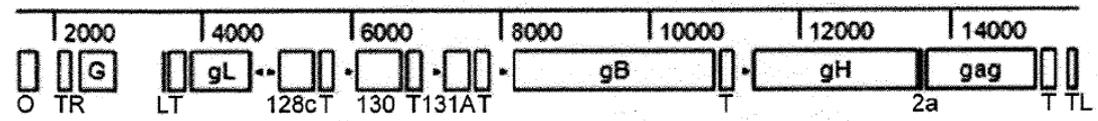
SEQ ID NO:27



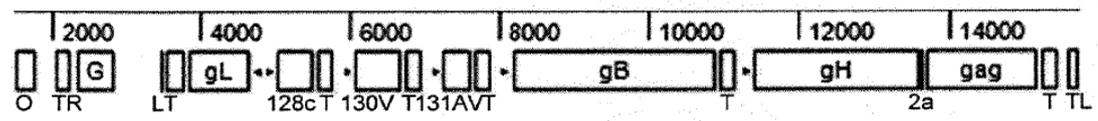
SEQ ID NO:28



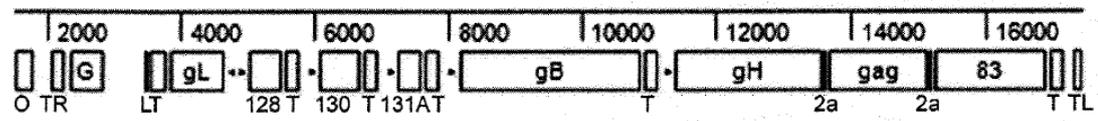
SEQ ID NO:29



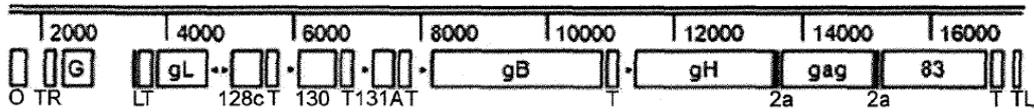
SEQ ID NO:30



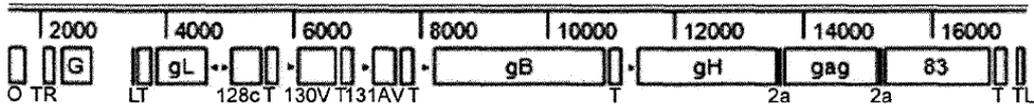
SEQ ID NO:31



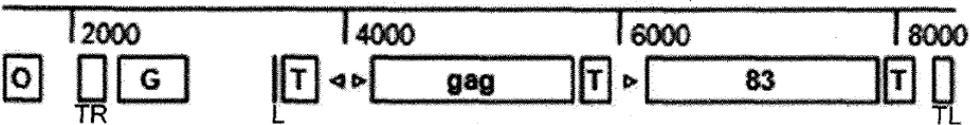
SEQ ID NO:32



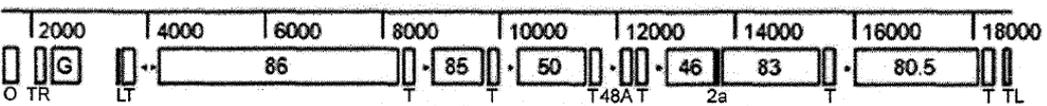
SEQ ID NO:33



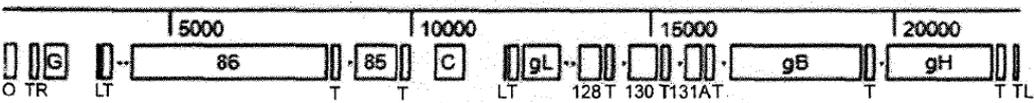
SEQ ID NO:34



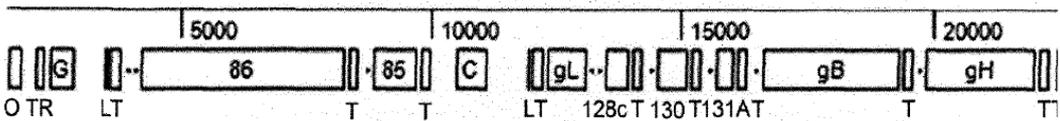
SEQ ID NO:35



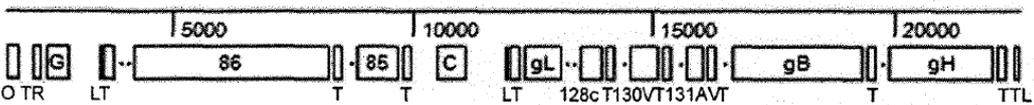
SEQ ID NO:36



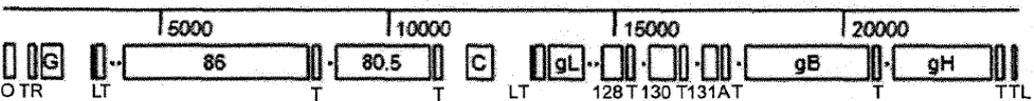
SEQ ID NO:37



SEQ ID NO:38



SEQ ID NO:39



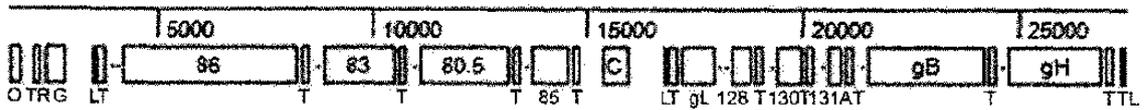
SEQ ID NO:40



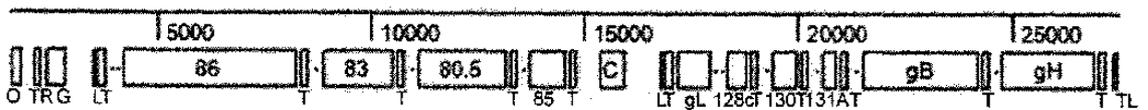
SEQ ID NO:41



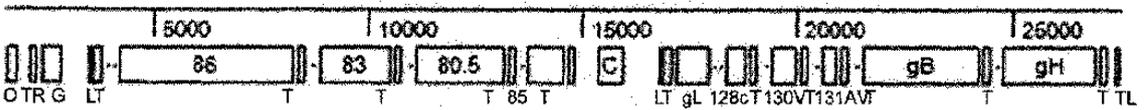
SEQ ID NO:42



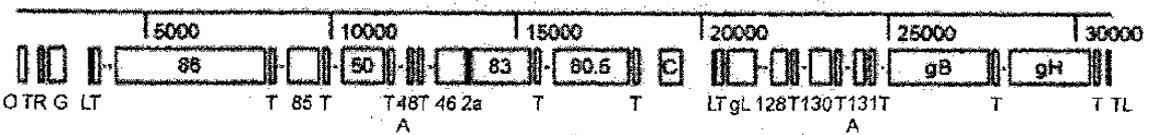
SEQ ID NO:43



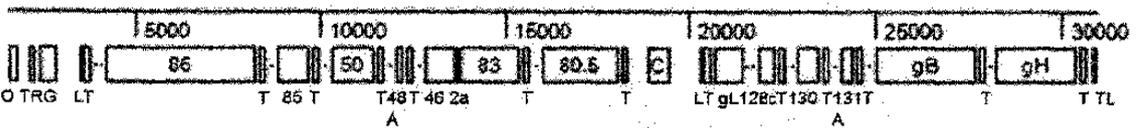
SEQ ID NO:44



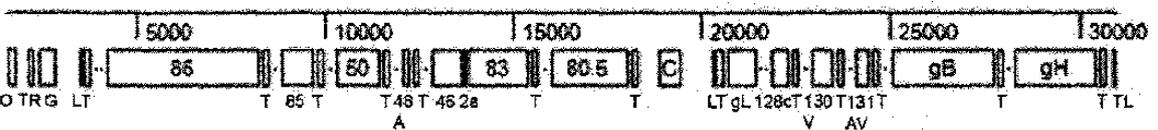
SEQ ID NO:45



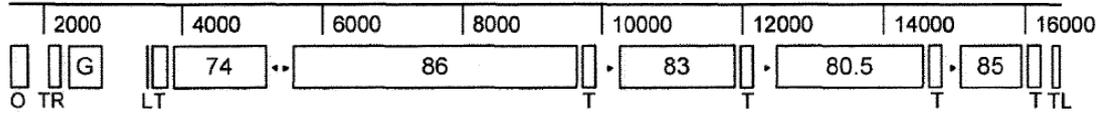
SEQ ID NO:46



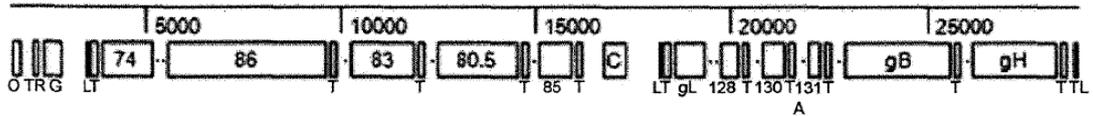
SEQ ID NO:47



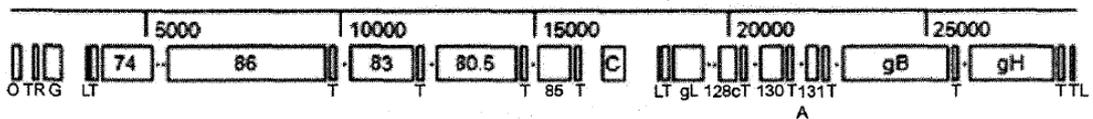
SEQ ID NO:48



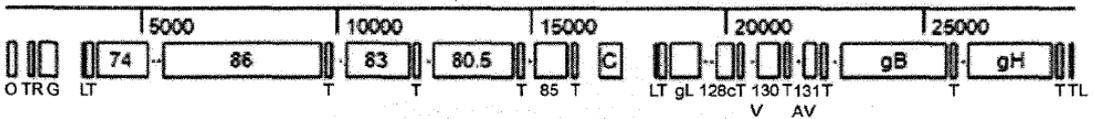
SEQ ID NO:49



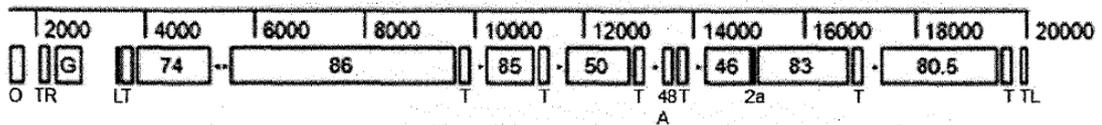
SEQ ID NO:50



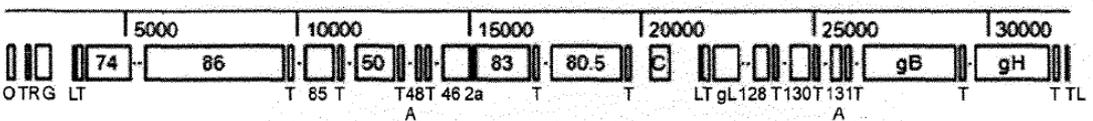
SEQ ID NO:51



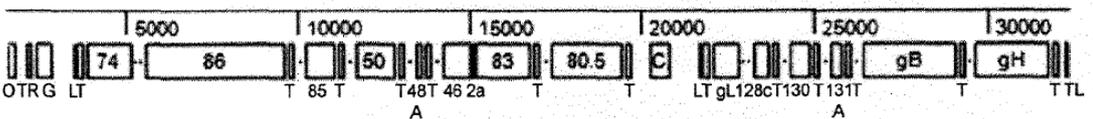
SEQ ID NO:52



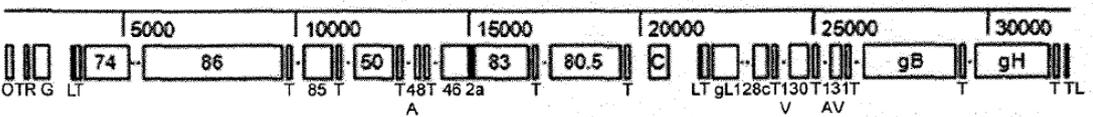
SEQ ID NO:53



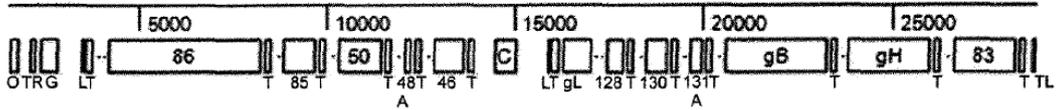
SEQ ID NO:54



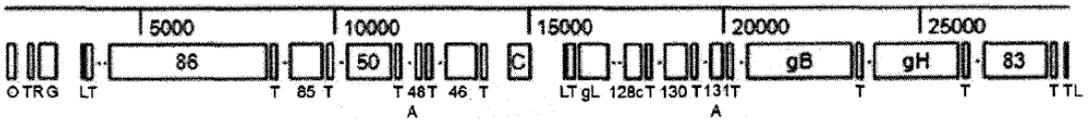
SEQ ID NO:55



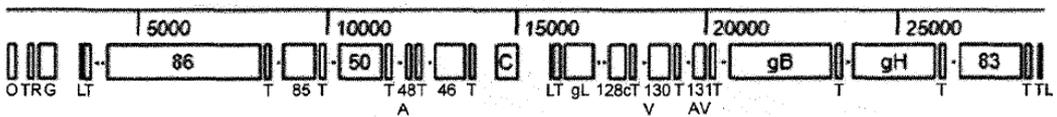
SEQ ID NO:56



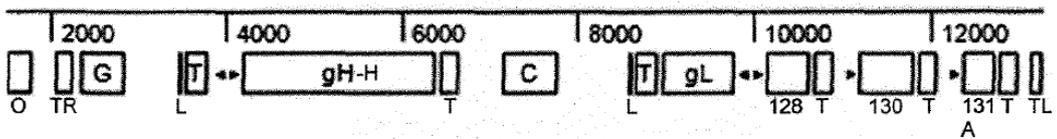
SEQ ID NO:57



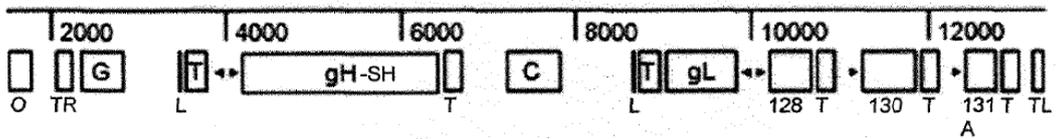
SEQ ID NO:58



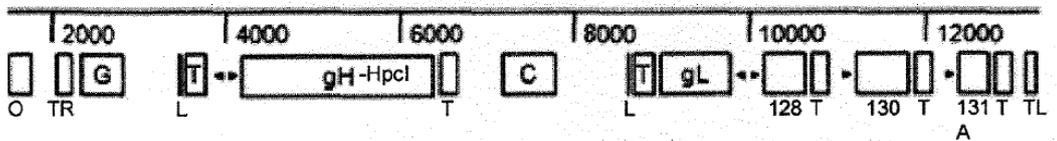
SEQ ID NO:59



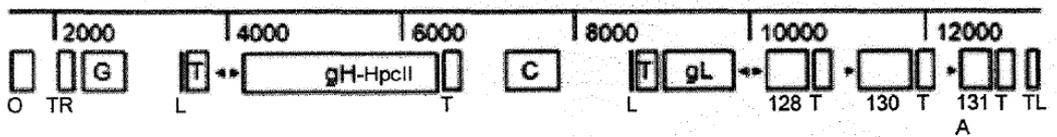
SEQ ID NO:60



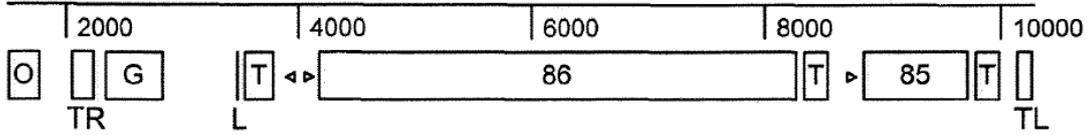
SEQ ID NO:61



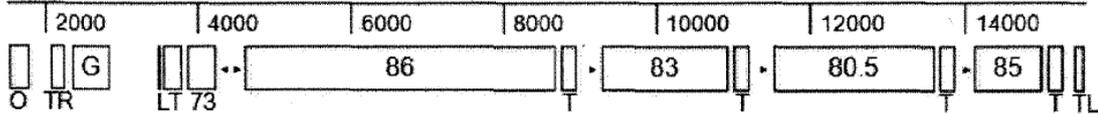
SEQ ID NO:62



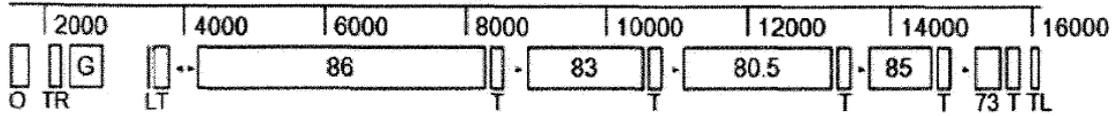
SEQ ID NO:67



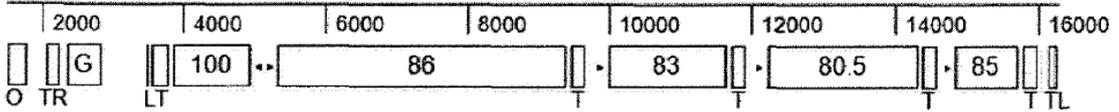
SEQ ID NO:68



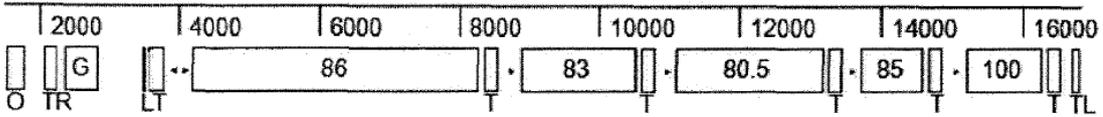
SEQ ID NO:69



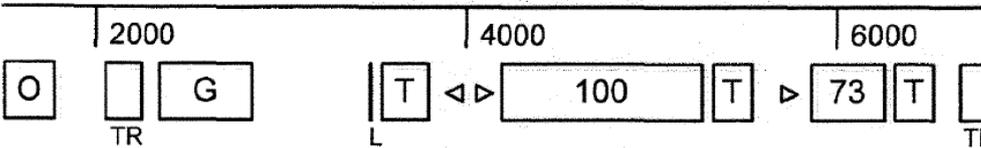
SEQ ID NO:70



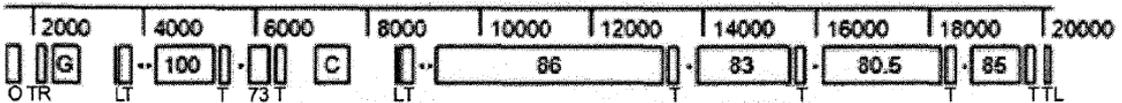
SEQ ID NO:71



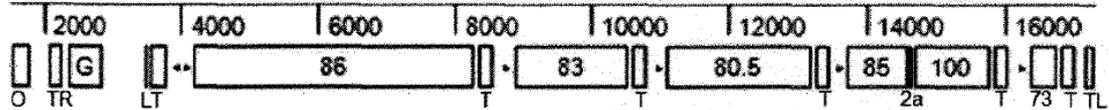
SEQ ID NO:72



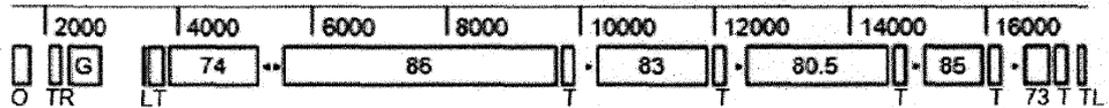
SEQ ID NO:73



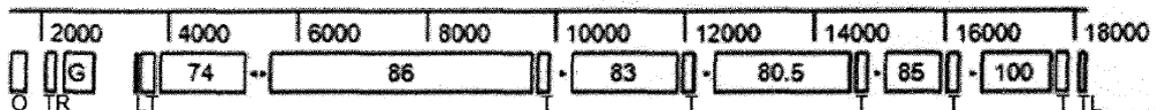
SEQ ID NO:74



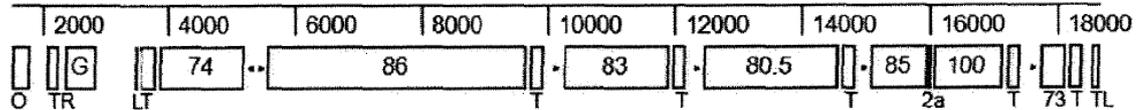
SEQ ID NO:75



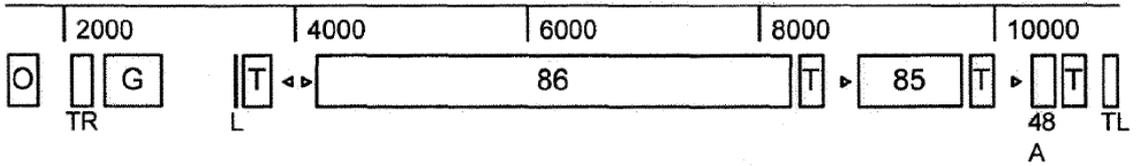
SEQ ID NO:76



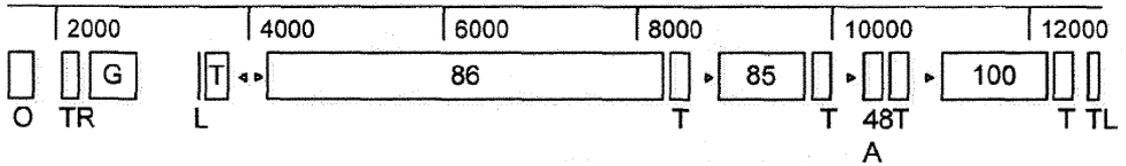
SEQ ID NO:77



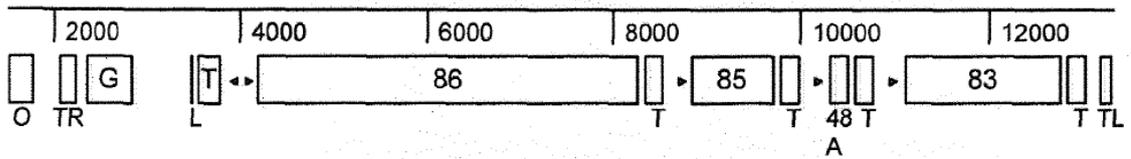
SEQ ID NO:78



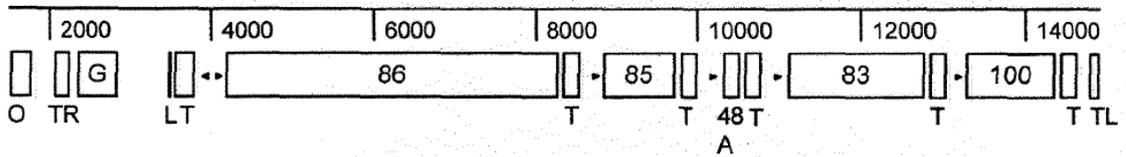
SEQ ID NO:79



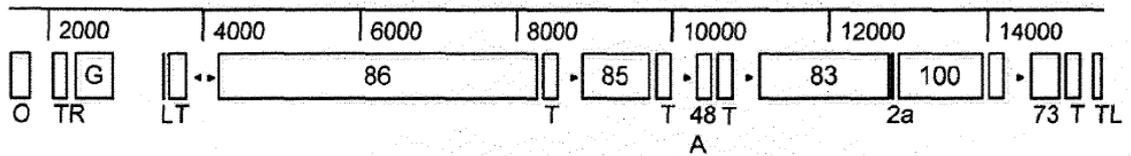
SEQ ID NO:80



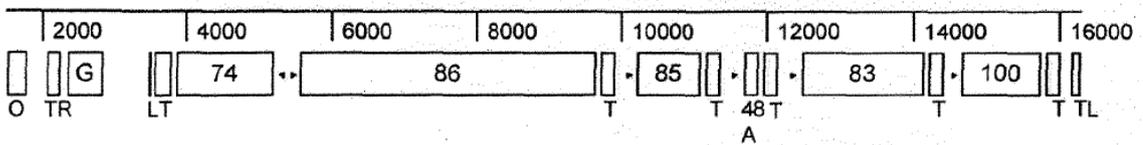
SEQ ID NO:81



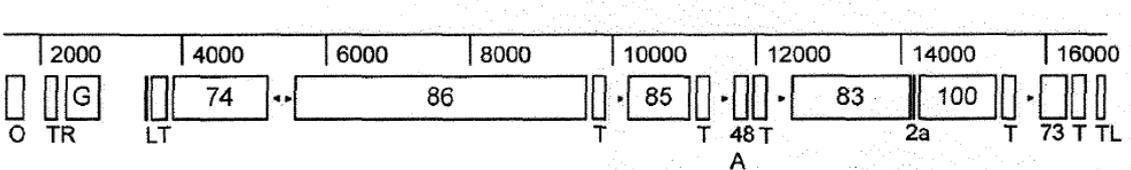
SEQ ID NO:82



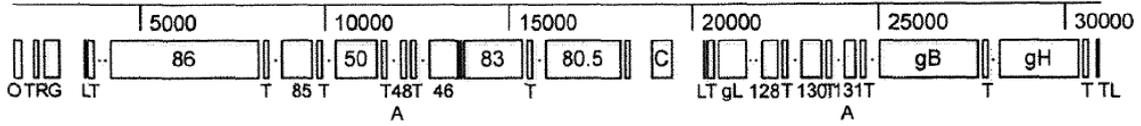
SEQ ID NO:83



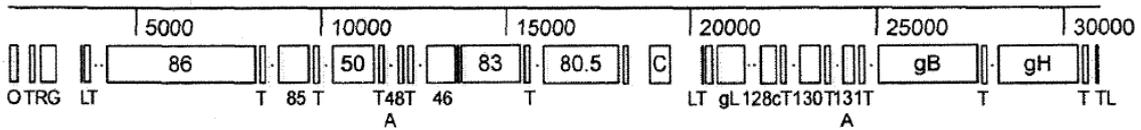
SEQ ID NO:84



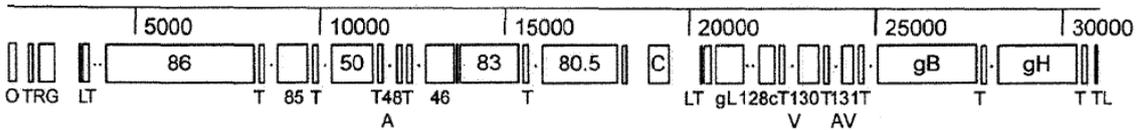
SEQ ID NO:85



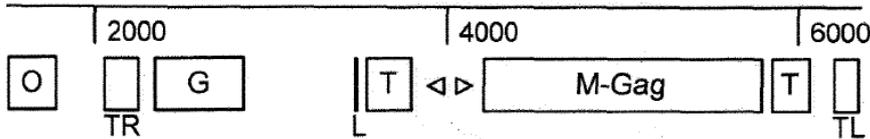
SEQ ID NO:86



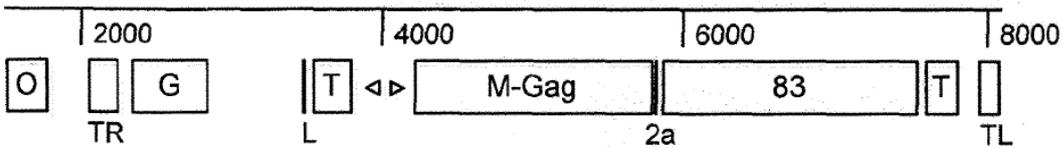
SEQ ID NO:87



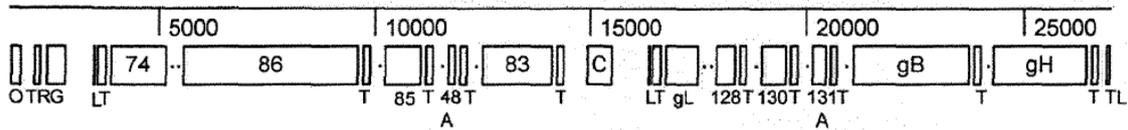
SEQ ID NO:88



SEQ ID NO:89



SEQ ID NO:90



SEQ ID NO:91

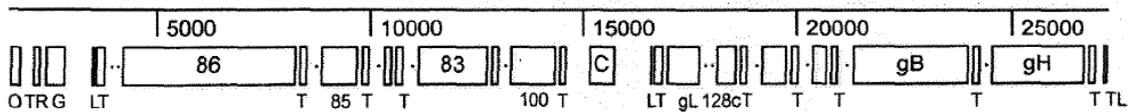
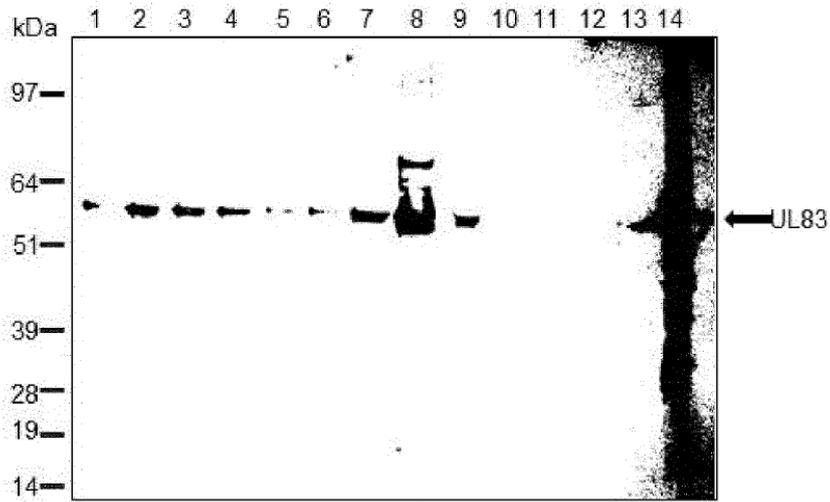


Fig. 2

A



B

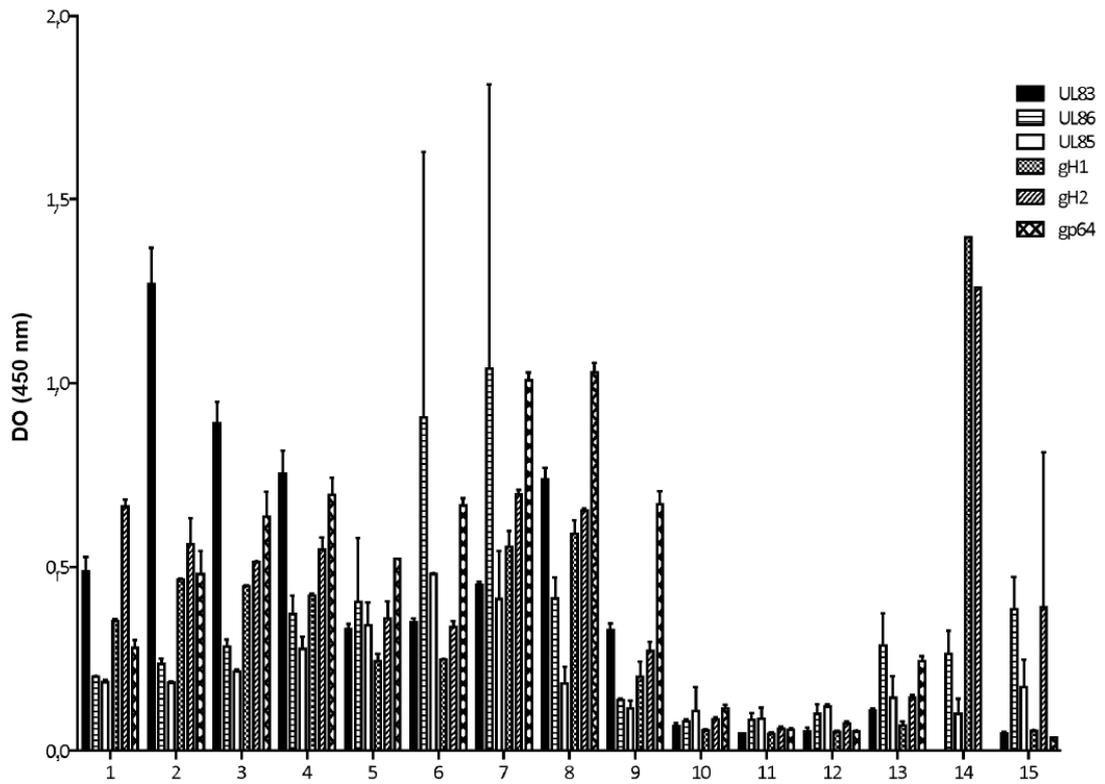


Fig. 3

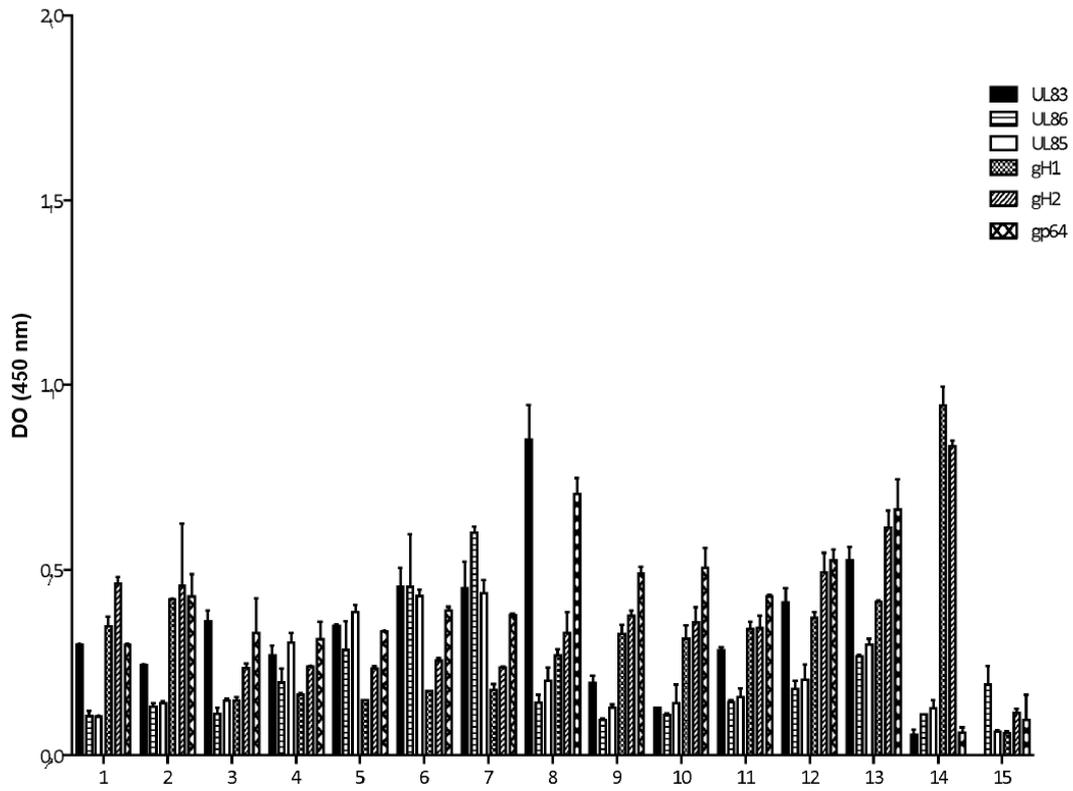


Fig. 4

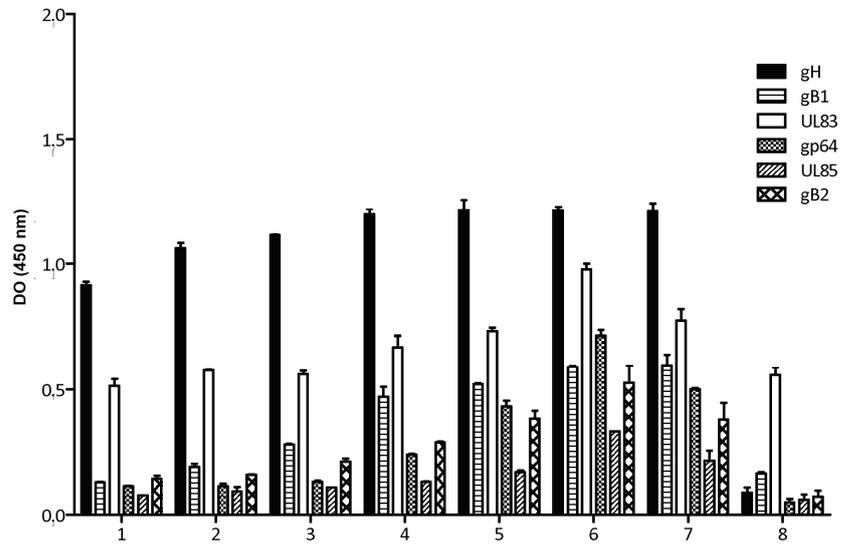


Fig. 5

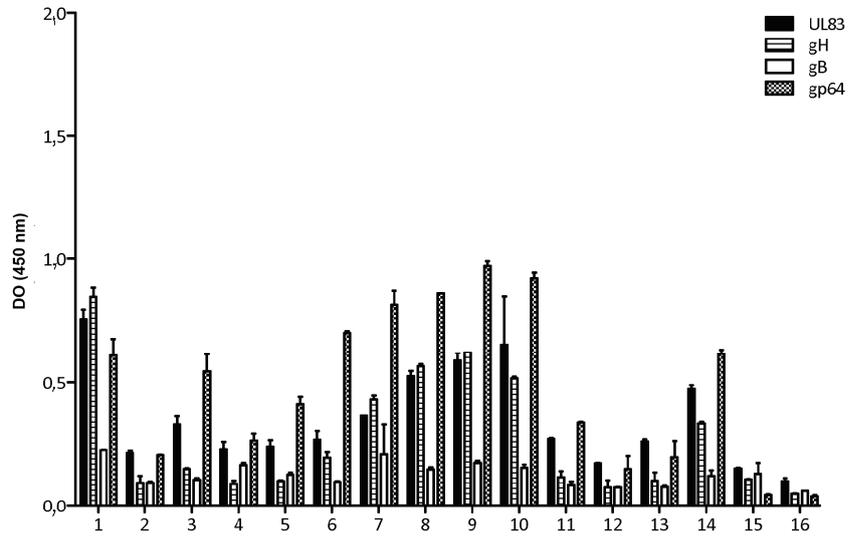
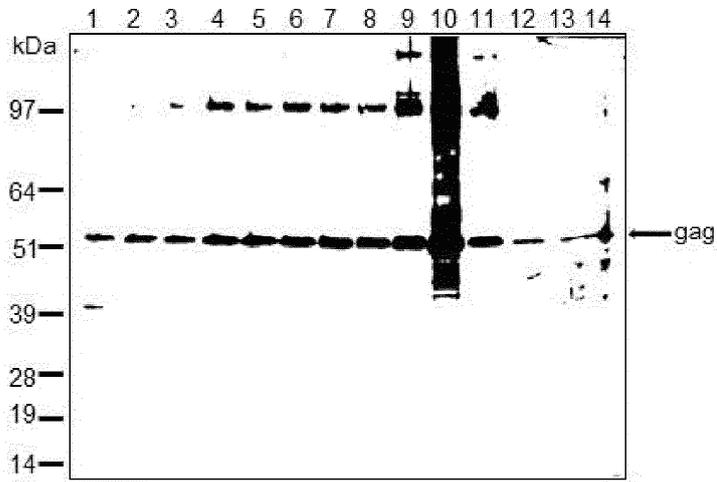


Fig. 6

A



B

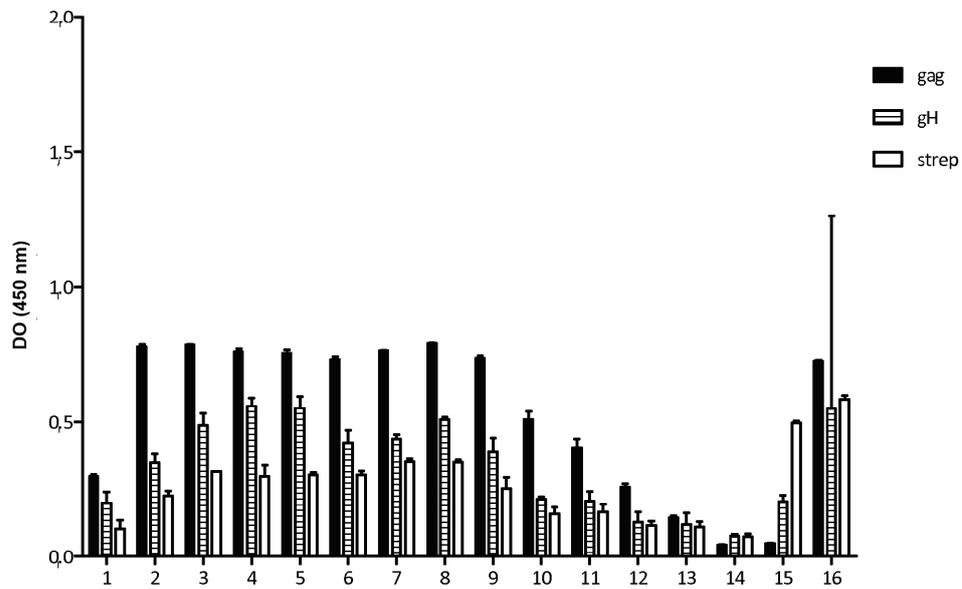
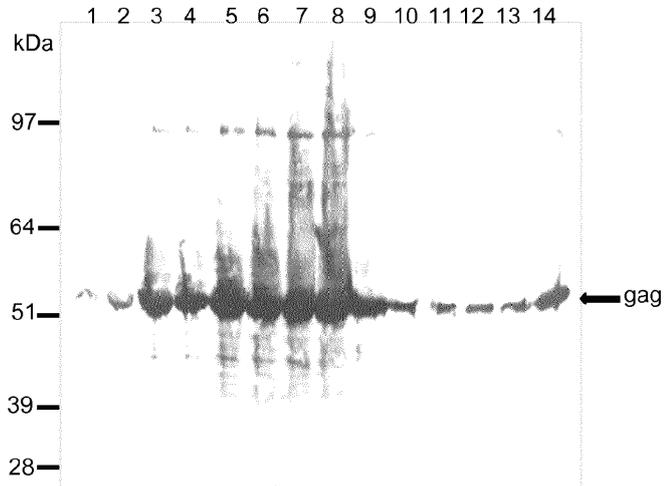


Fig. 7

A



B

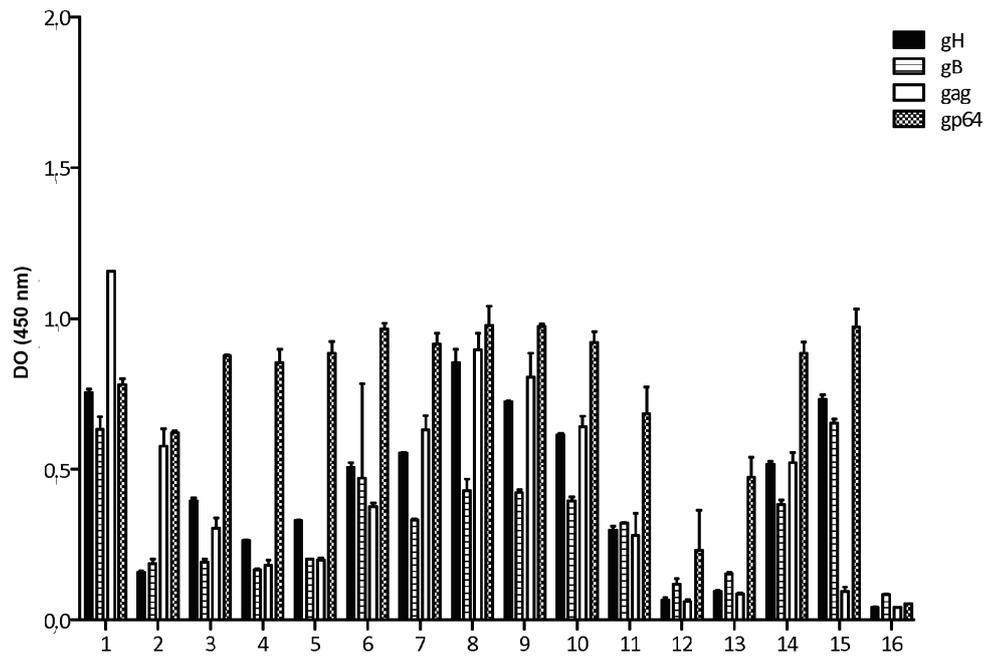


Fig. 8

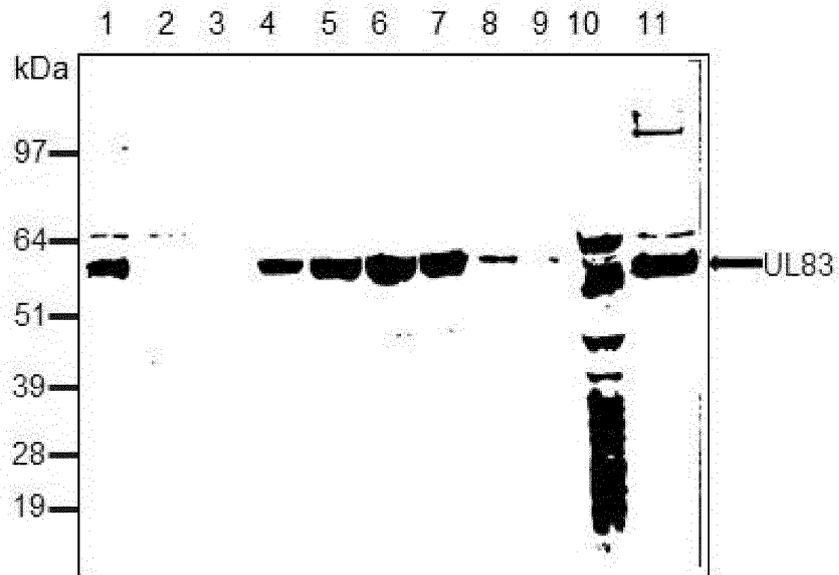
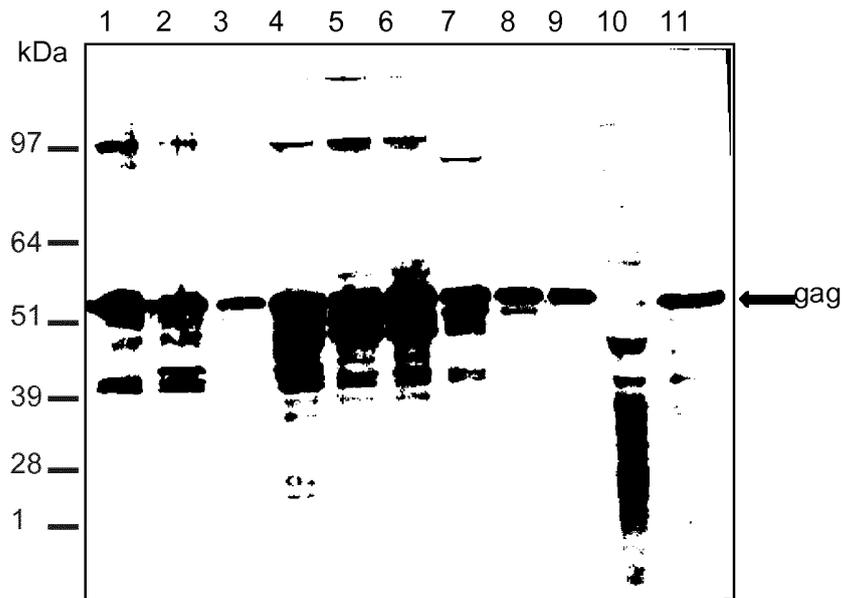


Fig. 9

A



B

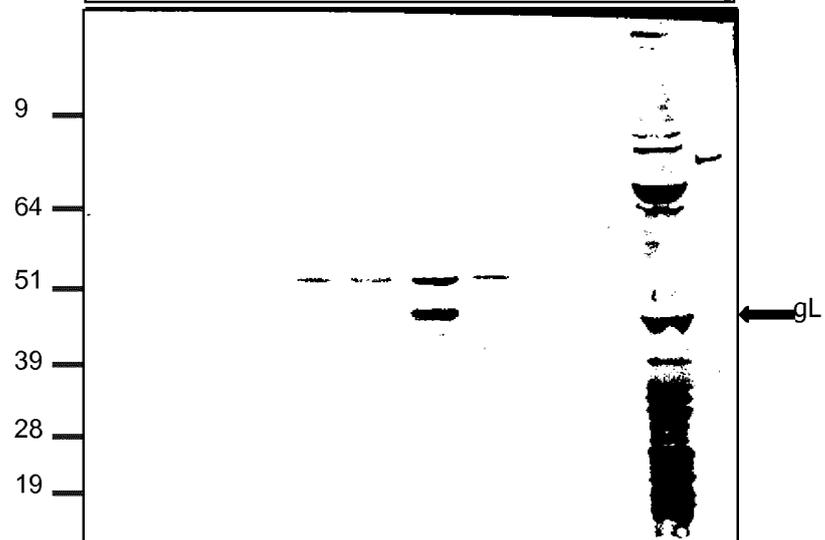


Fig. 10

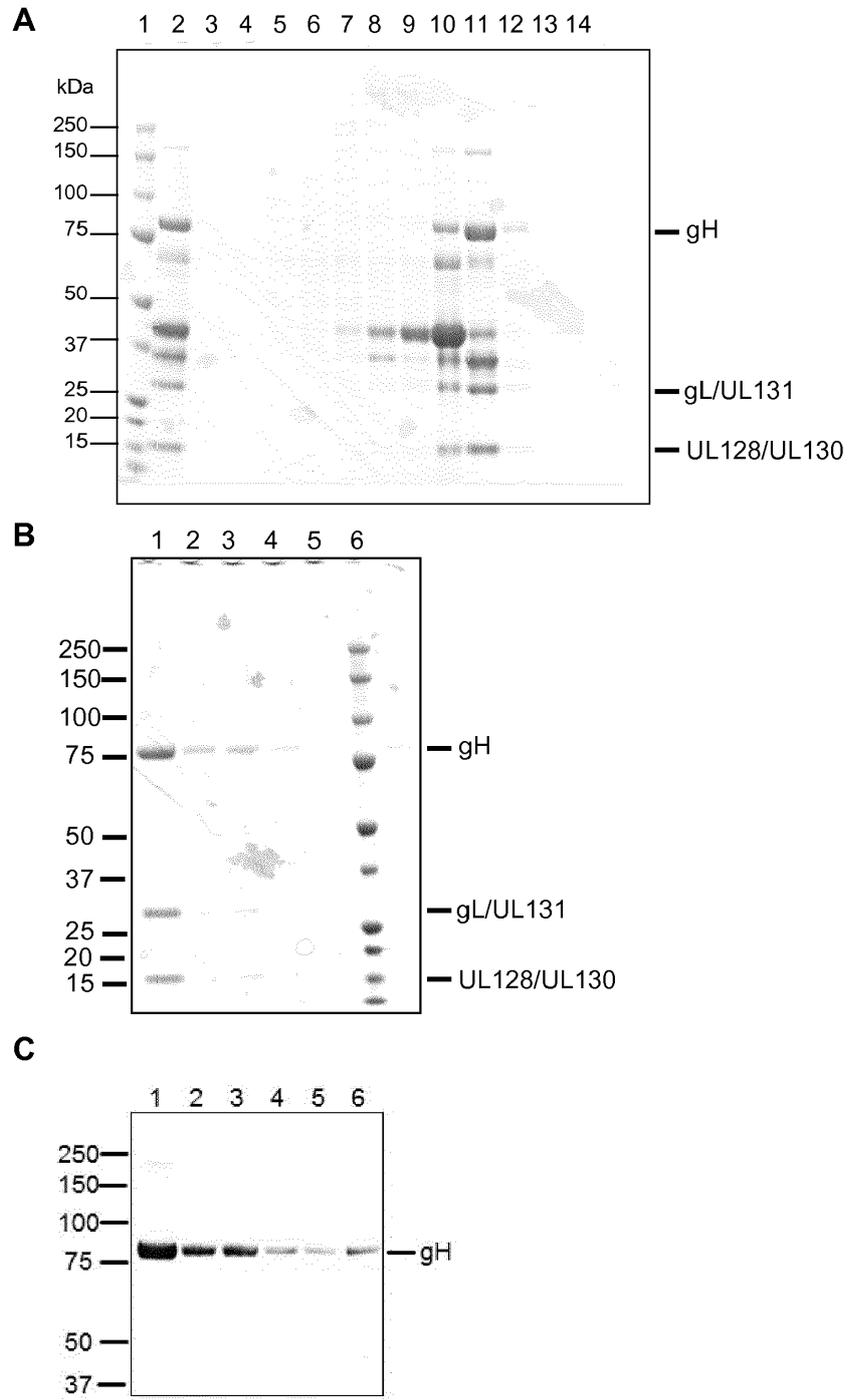
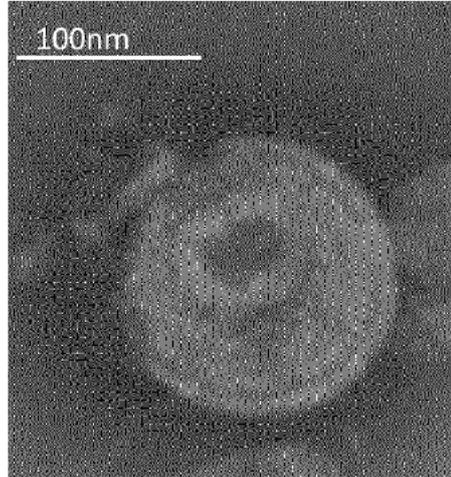


Fig. 11

A



B

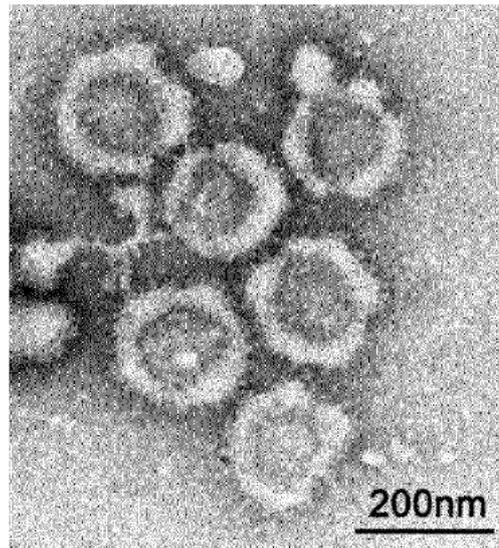
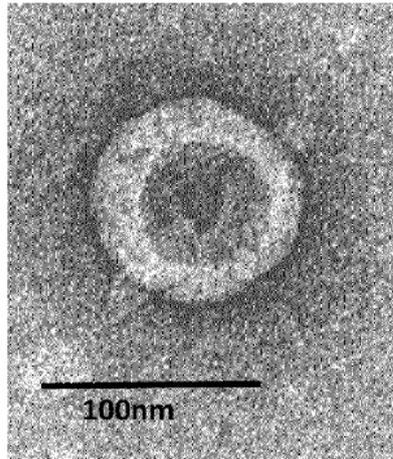


Fig. 12

A



B

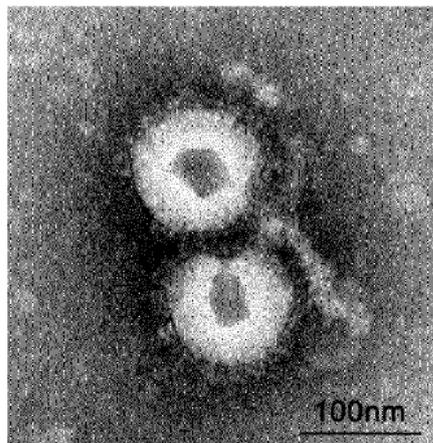


Fig. 13

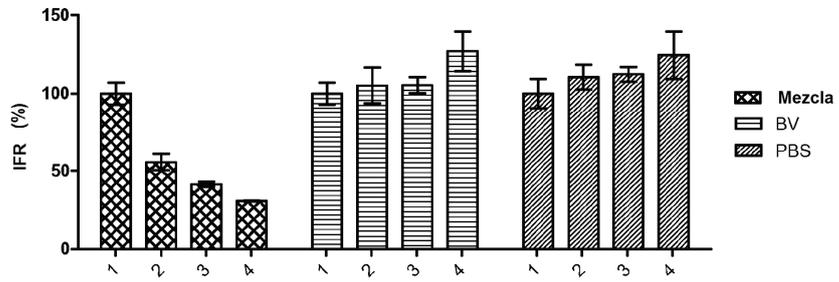


Fig. 14

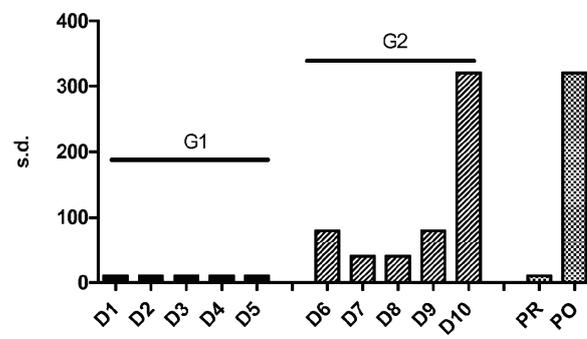


Fig. 15

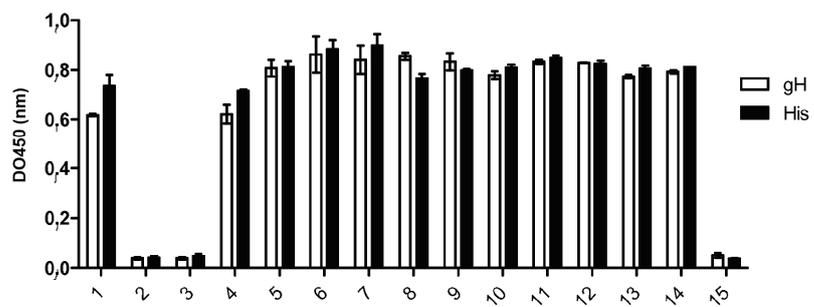


Fig. 16

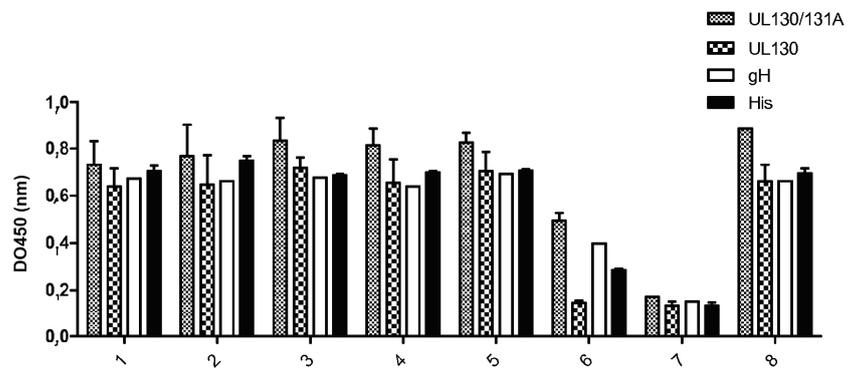


Fig. 17

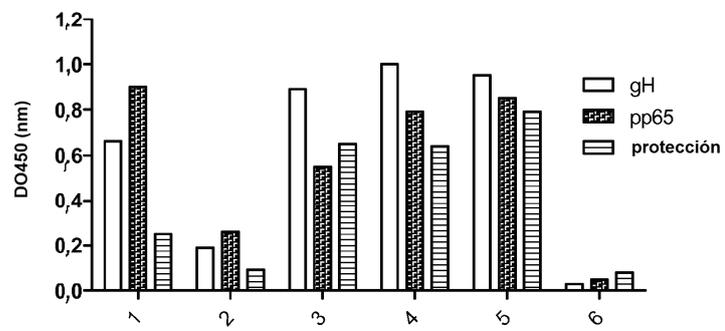


Fig. 18

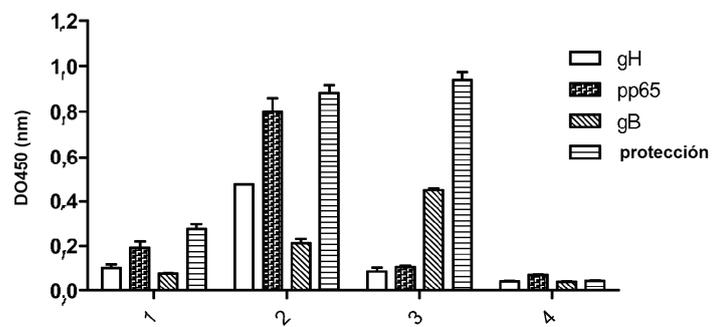
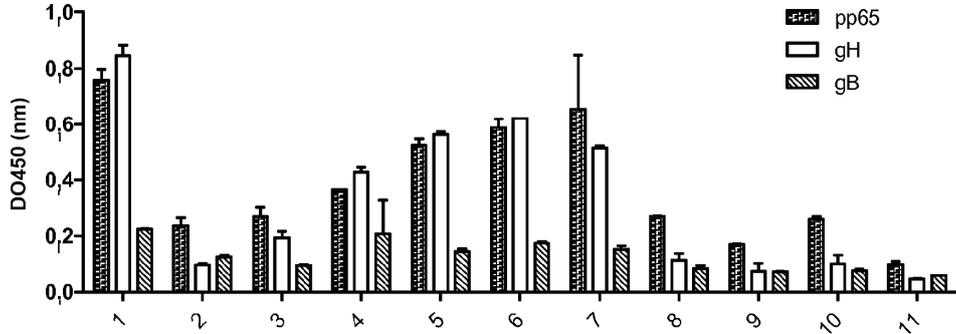


Fig. 19

A



B

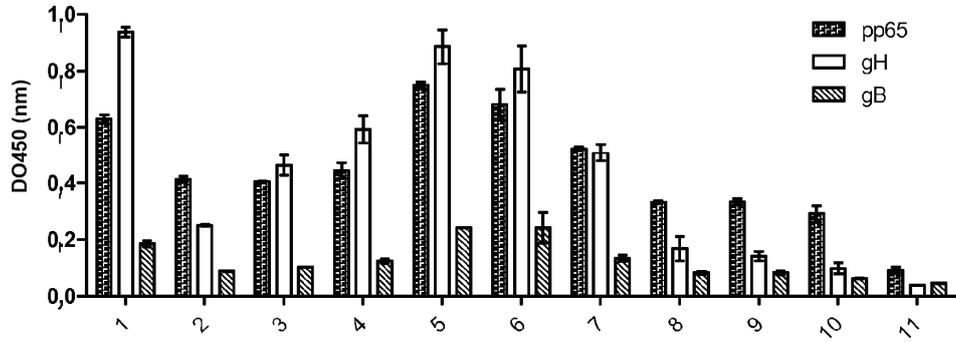
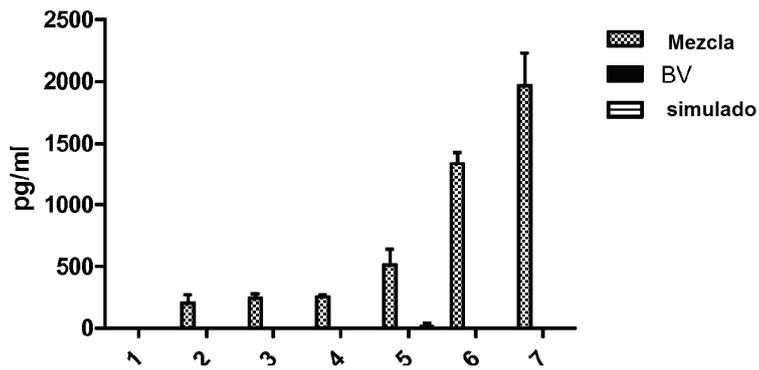
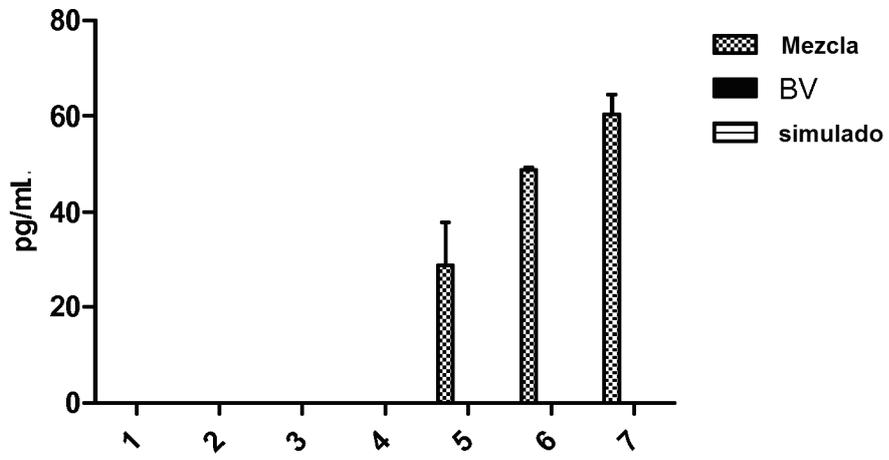


Fig. 20

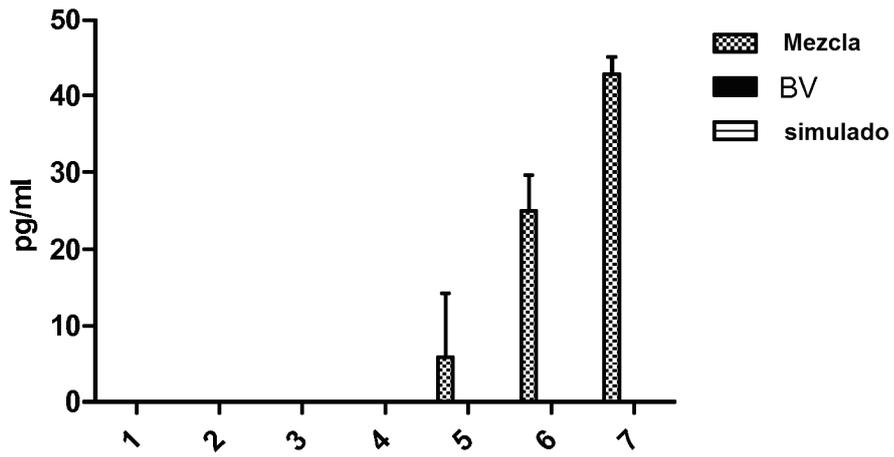
A



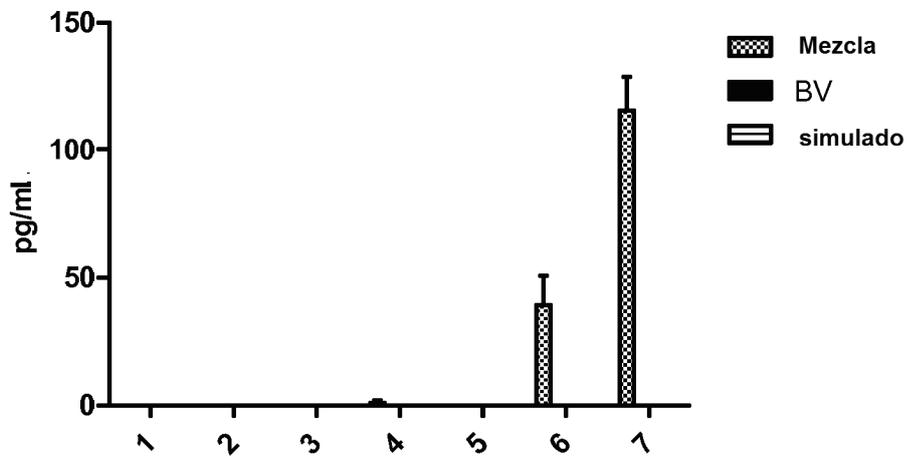
B



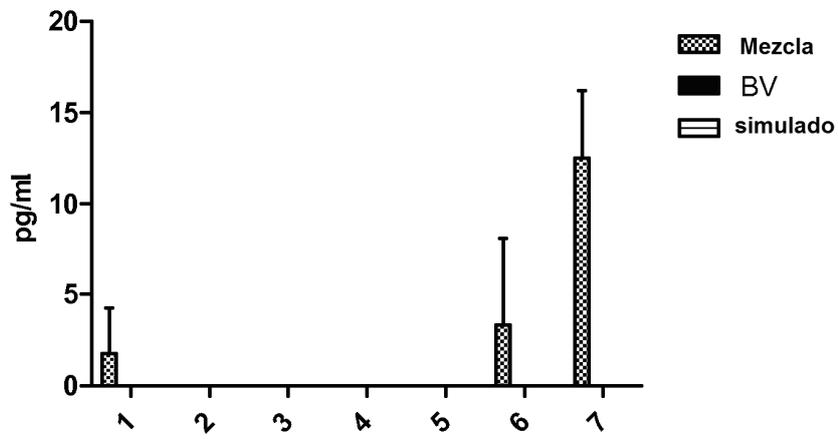
C



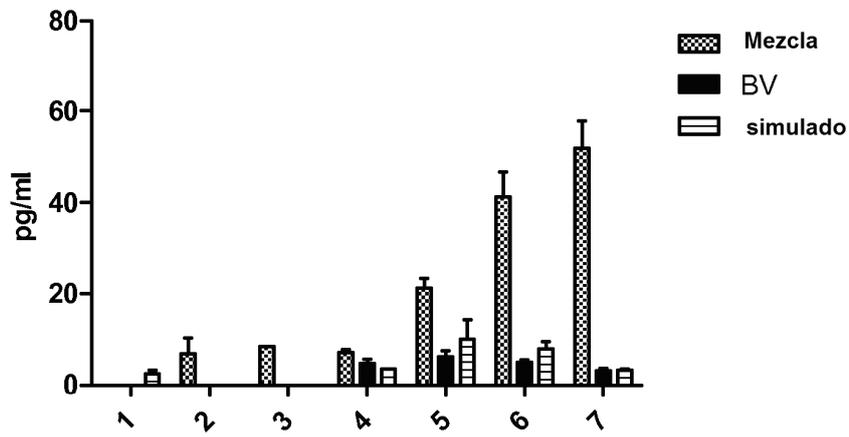
D



E



F



G

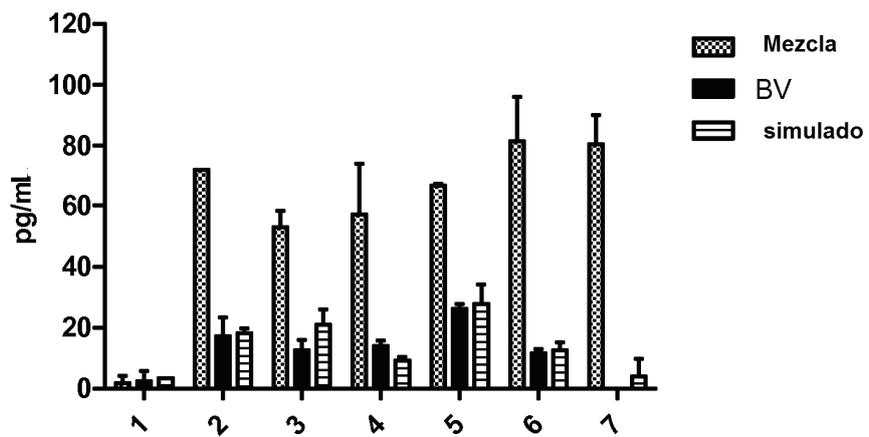
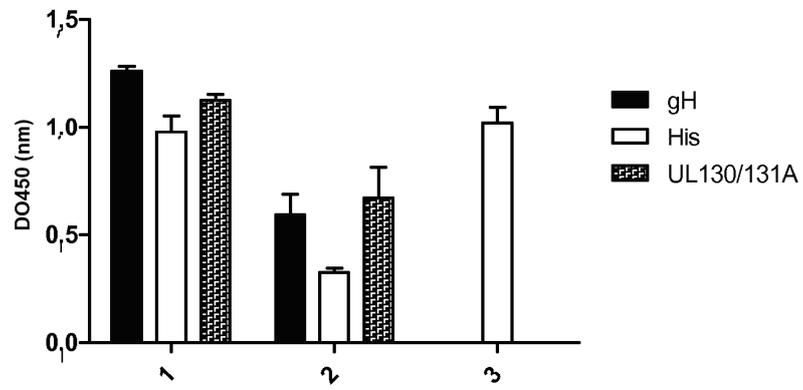
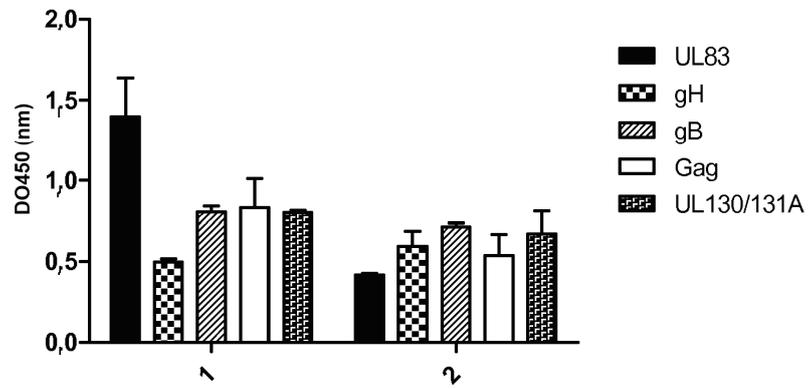


Fig. 21

A



B



C

