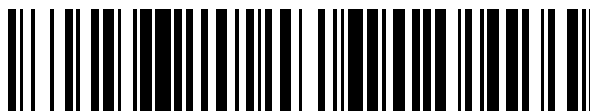


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 741**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2007 PCT/FR2007/000651**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2007 WO07119011**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2007 E 07731315 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2029748**

54 Título: **Proteínas de fusión proteína N de un virus de la familia Paramyxoviridae-proteína de interés**

30 Prioridad:

18.04.2006 FR 0603410

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

18.05.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
 AGRONOMIQUE (100.0%)
 147, RUE DE L'UNIVERSITE
 75338 PARIS CEDEX 07, FR**

72 Inventor/es:

**ELEOUËT, JEAN-FRANÇOIS y
 RIFFAULT, SABINE**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

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

ES 2 612 741 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

Proteínas de fusión proteína N de un virus de la familia *Paramyxoviridae*-proteína de interés.

5 **[0001]** La presente solicitud describe proteínas de fusión proteína N-proteína de interés, eventualmente en forma de complejos solubles proteína N-proteína de interés/proteína P, donde las proteínas N y P son proteínas de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*. Cuando la proteína de interés es un antígeno, la solicitud describe igualmente las composiciones vacunales y de los reactivos de diagnóstico que contienen esas proteínas de fusión proteína N-antígeno o esos complejos proteína N-antígeno/proteína P. La fusión proteína N-proteína de interés
10 también puede utilizarse como «vector» para transportar moléculas de interés terapéutico en las células, como antiviricos anticancerígenos.

[0002] El virus respiratorio sincicial (RSV según la denominación internacional) es responsable de la bronquiolitis del lactante (500 000 niños afectados cada año en Francia). No existe ningún tratamiento preventivo
15 (vacuna) ni ningún antivírico realmente eficaz contra esta enfermedad. Esta misma enfermedad existe en los bóvidos, afecta al 70 % de los terneros durante el primer año y la mortalidad puede llegar al 20 %. El RSV bovino es el principal agente responsable de enfermedades respiratorias graves de los terneros. El cuadro clínico es idéntico al de los humanos. Este virus pertenece al orden de los *Mononegavirales*, de la familia de los *Paramyxoviridae*. Las partículas víricas están revestidas de una envoltura lipídica que contiene dos proteínas principales, la proteína de
20 fusión (F) y la glicoproteína (G). En el interior de las partículas se encuentra un ARN monocatenario de polaridad negativa de aproximadamente 15 kb, asociado a la proteína de nucleocápside (N). Este complejo ARN-N constituye la matriz del complejo polimerasa constituido por la proteína L (large fragment) que es el ARN polimerasa ARN-dependiente, y su cofactor P (fosfoproteína) igualmente presentes en los viriones.

25 **[0003]** Hasta ahora no era posible purificar la proteína N de forma soluble, porque al expresarse de forma recombinante, se asocia espontáneamente y de forma no específica a los ARN celulares, formando estructuras de peso molecular muy elevado y no solubles (Méric et al. 1994 *Virus Res.* 31(2):187-201; Bhella et al., 2002 *Journal of General Virology*; 83, 1831-1839). Los inventores han desarrollado un procedimiento de obtención de la proteína de nucleocápside (N) del virus respiratorio sincicial (RSV) en forma recombinante soluble con una estructura de anillos y
30 su uso como vacuna. La proteína N se presenta en forma de anillos muy regulares de 7 nm de diámetro aproximadamente, que contienen 10 moléculas de proteína N y un ARN de origen bacteriano de 70 bases aproximadamente. La proteína N se coexpresa en el *E. coli* con la fosfoproteína (P) del RSV, más concretamente su extremo C-terminal, fusionada con la glutatión-S-transferasa (GST), que permite purificar los complejos por afinidad con las microesferas de sefarosa glutatión. Estas estructuras de anillos inducen una alta respuesta inmunitaria en el
35 ratón, en concreto por administración intranasal, incluso en ausencia de adyuvante. Este procedimiento se ha presentado en la solicitud de patente FR 2885139.

[0004] Ahora los Inventores han demostrado que es posible utilizar estas estructuras de anillos como vector vacunal. La viabilidad de esta tecnología se ha demostrado fusionando la proteína N con otra proteína, la GFP
40 (green fluorescent protein) por construcción plasmídica. Se ha coexpresado en el *E. coli* con la parte C-terminal de la proteína P (aminoácidos 161-241) fusionada en la GST. El análisis de las estructuras purificadas con el microscopio electrónico ha demostrado que el injerto de la GFP en C-terminal de la proteína N sigue permitiendo a la proteína N producirse en forma de anillos con un diámetro de 10 nm aproximadamente. Las proteínas de fusión N-GFP son fluorescentes.

45 **[0005]** Dado que los anillos N-ARN son extremadamente inmunógenos, los Inventores han inyectado estas estructuras a ratones para ver si podían inducir una alta respuesta de anticuerpos, concretamente contra la GFP. Las respuestas se han comparado con las obtenidas con la proteína GFP «normal», también purificada en forma recombinante a partir de *E. coli*. Los resultados obtenidos han mostrado una respuesta contra la GFP claramente
50 más fuerte (alrededor de unas 40 veces en el primer experimento) cuando se utilizan las estructuras de anillos.

[0006] La posibilidad de fusionar una proteína de interés con la proteína N y de purificar los complejos en forma de anillos solubles a escala industrial con un coste moderado (concretamente en el *E. coli*) podrá permitir
55 desarrollar vacunas contra cualquier tipo de epítipo poco o nada inmunógeno cuando se inyecta solo.

[0007] Además, los Inventores han demostrado que estas estructuras proteína N-GFP/proteína P son adsorbidas y e interiorizadas eficazmente por diferentes tipos celulares. Estos resultados demuestran el interés de estas fusiones proteína N-proteína de interés, eventualmente en forma de complejo proteína N-proteína de interés/proteína P, como vector de antígeno en vacunación, o más generalmente de moléculas de interés
60 terapéutico.

[0008] La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un complejo proteína N-proteína

de interés/proteína P, las proteínas N y P son proteínas de un virus respiratorio sincicial (RSV), dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

- a) coexpresar una proteína de fusión proteína N de un virus respiratorio sincicial -proteína de interés, con una
 5 proteína P truncada del mismo virus respiratorio sincicial, en la que la proteína de interés se fusiona en fase al extremo C-terminal de la proteína N, la proteína N es una proteína nativa o una proteína N modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, dicha proteína N conserva la capacidad de interactuar con la proteína P, y la proteína P truncada no contiene el dominio de oligomerización P y contiene un dominio de unión a la proteína N;
- 10 b) recoger los complejos proteína N-proteína de interés/proteína P que se formen de este modo.

[0009] La invención también se refiere a un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P en forma de anillos solubles que contienen la proteína de fusión proteína N-proteína de interés con su ARN, las proteínas N y P son proteínas de un virus respiratorio sincicial, en el que la proteína de interés se fusiona en fase al extremo C-
 15 terminal de la proteína N, la proteína N es una proteína nativa o una proteína N modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, dicha proteína N conserva la capacidad de interactuar con la proteína P, la proteína P es una proteína P truncada del mismo virus respiratorio sincicial que no contiene el dominio de oligomerización P y contiene un dominio de unión a la proteína N.

20 **[0010]** La invención se refiere además a un procedimiento de preparación de una proteína N de un virus respiratorio sincicial, fusionado en fase a su extremo C-terminal con una proteína de interés, dicho procedimiento consta de la separación de la proteína de fusión proteína N-proteína de interés a partir del complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según la invención.

25 **[0011]** La invención se refiere igualmente a una proteína de fusión proteína N-proteína de interés, aislada, estructurada en anillos solubles que contienen la proteína de fusión proteína N-proteína de interés con su ARN, que puede obtenerse por el procedimiento de preparación según la invención, donde la proteína N es una proteína N de un virus respiratorio sincicial y la proteína de interés se fusiona en fase, al extremo C-terminal de la proteína N.

30 **[0012]** La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una proteína N de un virus respiratorio sincicial fusionado con una proteína de interés o un complejo de proteína N-proteína de interés/proteína P según la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0013] La invención se refiere a un reactivo diagnóstico que contiene una proteína de fusión según la
 35 invención, en la que la proteína de interés es un antígeno.

[0014] La invención se refiere igualmente a la utilización de una proteína de fusión según la invención que contiene un antígeno fusionado en fase al extremo C-terminal de una proteína N de un virus respiratorio sincicial para la detección in vitro de anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno de la proteína de fusión.

40 **[0015]** La invención se refiere además a un procedimiento de detección de anticuerpos específicos de un antígeno, en una muestra biológica, que consta de los siguientes pasos:

- a) poner en contacto dicha muestra biológica con una proteína de fusión según la invención que contiene un
 45 antígeno fusionado en fase en C-terminal de una proteína N de un virus respiratorio sincicial;
- b) detectar los complejos de proteína de fusión N-antígeno/anticuerpo formados, porque la presencia de dichos complejos revela la presencia de anticuerpos específicos del antígeno en la muestra biológica.

Definiciones

50 **[0016]** La familia de los virus «*Paramyxoviridae*» agrupa a las subfamilias de los *Paramyxovirinae* y de los *Pneumovirinae*. Dentro de los *Paramyxovirinae* se encuentran los géneros *Respirovirus*, cuyo virus prototípico es el virus de Sendai, *Rubulavirus* (en concreto el virus de las paperas), y *Morbilivirus*, como el virus del sarampión. Dentro de cada uno de los géneros *Respirovirus* y *Rubulavirus* se encuentran cepas del virus paragripal. Dentro de
 55 la subfamilia de los *Pneumovirinae* se encuentran dos géneros, los *Pneumovirus* y los *Metapneumovirus*, y dentro de este último se encuentra el *Metapneumovirus* humano. El virus respiratorio sincicial (RSV) humano es el virus prototípico del género *Pneumovirus* que pertenece a la subfamilia de los *Pneumovirinae*. Dentro de los *Pneumovirus* se encuentran igualmente las cepas bovina y murina del RSV.

60 **[0017]** Sin más precisiones, por «virus respiratorio sincicial» se entiende, de forma general, el RSV, sea cual sea su forma (humana, bovina...), subgrupo (por ejemplo los subgrupos A, B y S identificados en el RSV humano) o cepa considerada.

- [0018]** «Proteína N» designa la proteína de nucleocápside de los *Paramyxoviridae* que forma estructuras helicoidales para rodear al genoma viral. La proteína N del RSV humano cepa Long presenta una secuencia de 391 aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 1. La proteína N del RSV bovino presenta igualmente 391 aminoácidos (ver 5 SEQ ID NO: 2). Asimismo, se encuentran descritas una proteína N del virus de Sendai (cepa Hamamatsu), del virus del sarampión (cepa Edmonston B), del virus de las paperas (cepa SBL-1) y del *Metapneumovirus* humano (cepa 00-1) en la base de datos Swissprot con los números de acceso Q9DUE3 (SEQ ID NO:3), Q89933 (SEQ ID NO:4), P21277 (SEQ ID NO:5), y Q91 F57 (SEQ ID NO:6), respectivamente.
- 10 **[0019]** La expresión «proteína P» designa la Fosfoproteína o proteína P que forma parte del complejo Polimerasa de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*. La proteína P es un cofactor de la polimerasa (replicasa/transcriptasa) vírica y puede estar fosforilada. Los expertos en la materia conocen las secuencias de proteínas P de los *Paramyxoviridae*. Por ejemplo, la proteína P del RSV humano cepa Long presenta una secuencia de 241 aminoácidos que se ha registrado en la base de datos Swissprot con el número de acceso P12579. Esta 15 secuencia se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 7. La proteína P del RSV bovino también consta de 241 aminoácidos (SEQ ID NO: 8). Asimismo, se encuentran descritas una proteína P del virus de Sendai (cepa Harris), del virus del sarampión (cepa Edmonston B), del virus de las paperas (cepa SBL-1), y del *Metapneumovirus* humano (cepa 00-1) en la base de datos Swissprot con los números de acceso P04859 (SEQ ID NO:9), CAA91364 (SEQ ID NO:10), P19717 (SEQ ID NO:11), y Q91KZ5 (SEQ ID NO:12), respectivamente. La expresión «proteína P» puede 20 designar una proteína P entera, una proteína P truncada o un fragmento de la proteína P.
- [0020]** La proteína P de los *Paramyxoviridae* forma homo-oligómeros, en concreto homo-tetrámeros, por ejemplo en el virus de Sendai o el RSV. En cuanto al RSV, se ha cartografiado un dominio de la proteína P capaz de oligomerizarse (oligomerización P-P) a nivel de los aminoácidos 120 a 150 de esta proteína (Castagné et al., 2004; 25 *Journal of General Virology*; 85: 1643-1653). Así, por ejemplo, el fragmento formado por los aminoácidos 161 a 241 de la proteína P del RSV no forma oligómeros. El dominio de oligomerización de la proteína P del virus de Sendai ha sido descrito por Tarbouriech et al. (2000; *Nature Structural Biology*; 7, 777-781) como estando constituido por los residuos 320 a 446 de la proteína P. Por otro lado, la región de oligomerización P se ha identificado a nivel de los aminoácidos 304-376 para la proteína P del virus del sarampión (Johansson et al., 2003; *Journal of Biological* 30 *Chemistry*; 278, p 44567-44573).
- [0021]** Las secuencias de las proteínas P y N descritas anteriormente tienen un carácter ilustrativo, y son susceptibles de presentar variaciones en función de la cepa particular considerada para un virus determinado. Así, las posiciones de los aminoácidos mencionados a continuación en la demanda se indican en relación a estas 35 secuencias de referencia. El experto en la materia puede identificar los dominios correspondientes en otras cepas de virus diferentes a las ejemplificadas, en concreto con ayuda de alineamientos de secuencia realizados con programas como Clustalw, por ejemplo.
- [0022]** Las secuencias codificantes de estas proteínas N y P de virus de la familia de los *Paramyxoviridae* 40 también son conocidas para el experto en la materia.
- [0023]** «Proteína marcador», también llamada «proteine tag», designa una proteína que se utiliza en fusión con una proteína de interés para facilitar la purificación. Las proteínas marcador son conocidas para los expertos en la materia. Algunos ejemplos de proteínas marcador son la glutatión-S-transferasa (GST) o los marcadores que son 45 secuencias que contienen generalmente un encadenamiento de 4 a 10 residuos de histidina.
- [0024]** Una «proteína de interés» designa una proteína, un polipéptido o un péptido (uno u otro término se emplean indiferentemente) cualquiera, como por ejemplo, una proteína marcador o una proteína de interés 50 terapéutico o vacunal.
- [0025]** Una proteína de interés puede ser por ejemplo la proteína GFP («Green Fluorescent Protein»), codificada por el gen indicador *gfp*.
- [0026]** Una proteína de interés terapéutico puede, por ejemplo, ser un polipéptido antiangiogénico, por ejemplo RGD o una secuencia que incluya RGD, endostatina o un polipéptido proapoptótico como la «apoptosis inducing factor» (AIF), que pueden utilizarse como agentes anticancerígenos, un polipéptido capaz de interactuar 55 específicamente con proteínas víricas e interferir con los mecanismos que permiten la replicación de un virus, o una toxina.
- 60 **[0027]** La proteína de interés heteróloga puede ser un antígeno, en concreto, una proteína antigénica de interés vacunal. Por «antígeno» o «Ag» se entiende una secuencia de naturaleza peptídica o glicopeptídica susceptible de inducir una respuesta inmunitaria en un anfitrión al que se le ha administrado. Así, un antígeno puede

ser una proteína o una parte de proteína (polipéptido) o incluso un pequeño péptido que corresponda potencialmente a un epítipo.

5 **[0028]** Un «epítipo» es la parte de un antígeno reconocida por un anticuerpo o un receptor linfocitario. Un epítipo (linear) está formado generalmente por una secuencia de 7 a 15 aminoácidos. Un antígeno en el sentido de la invención puede estar formado por un epítipo, contener un epítipo o ser una proteína antigénica.

10 **[0029]** Preferentemente, el antígeno es un antígeno derivado de un microorganismo patógeno, como un virus, una bacteria, un hongo o un organismo metazoico o protozoico parásito.

15 **[0030]** Algunos ejemplos de virus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), de la hepatitis B (HBV), de la hepatitis C (HCV), del herpes (*Herpes simplex*), de la gripe (o de la gripe aviar), del Nilo Occidental, de la fiebre amarilla, el citomegalovirus, el papilomavirus, (HPV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el RSV, el virus del Dengue y el virus chikungunya.

20 **[0031]** Algunos ejemplos de parásitos incluyen los parásitos responsables de la malaria (*Plasmodium*, en particular *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), y de la tripanosomiasis (en concreto, enfermedad el sueño (*T. brucei*) y enfermedad de Chagas (*T. cruzi*)).

25 **[0032]** El patógeno también puede ser un hongo como el *Candida albicans*, responsable de la candidosis.

[0033] Las bacterias pueden ser, por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Clostridium tetani*, *Mycobacterium tuberculosis*, o *Mycobacterium bovis*.

30 **[0034]** Por ejemplo, un antígeno puede ser la GFP, una glicoproteína vírica como la proteína de fusión (F) del RSV, la hemaglutinina del virus de la gripe, o la proteína gp120 del HIV, un toxoide bacteriano como el toxoide tetánico, o un epítipo de estos.

Proteínas de fusión proteína N-proteína de interés y su preparación

35 **[0035]** La solicitud describe una proteína de fusión proteína N-proteína de interés, que contiene una proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae* y una proteína de interés fusionada en fase, en C-terminal de la proteína N.

40 **[0036]** En el contexto de la presente invención, la proteína de interés está fusionada específicamente en C-terminal de la proteína N. Esta construcción permite que la proteína N se incorpore en estructuras de anillos de 10 nm de diámetro aproximadamente cuando se usa en un procedimiento de producción de la proteína como el que se describe más adelante.

45 **[0037]** Dicho virus de la familia de los *Paramyxoviridae* puede ser un *Paramyxovirinae* o un *Pneumovirinae*. En concreto, el virus puede seleccionarse en el grupo formado por el virus de las paperas, el virus del sarampión, el *Metapneumovirus* humano, y el virus paragripal. Preferentemente, el virus es un *Pneumovirus*, en concreto, el virus respiratorio sincicial (RSV), humano o bovino.

50 **[0038]** La proteína N presente en la proteína de fusión aquí descrita generalmente tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína N nativa, es decir, naturalmente presente en un virus *Paramyxoviridae*.

[0039] Sin embargo, por necesidades de expresión de la proteína de fusión, se pueden realizar modificaciones de secuencia a nivel del extremo C-terminal de la proteína N, a condición de que la proteína N conserve su capacidad de interactuar con la proteína P. En concreto, una proteína N nativa de un virus *Paramyxoviridae* puede haber sido modificada en la región definida por los 25, preferentemente los 20, 15, 10 o 5, últimos aminoácidos C-terminales.

55 **[0040]** Estas modificaciones consisten típicamente en una supresión, sustitución y/o inserción de uno o varios aminoácidos (por ejemplo de 1 a 25, o 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o incluso 1 a 5 aminoácidos contiguos o no) en la secuencia C-terminal de la proteína N.

60 **[0041]** Un ejemplo de modificación de secuencia de la proteína N puede consistir en una supresión de los 6 o 12 aminoácidos C-terminales, dichas proteínas N truncadas (N Δ 6C y N Δ 12C) siguen siendo todavía capaces de interactuar con la proteína P.

[0042] La proteína de interés puede ser una proteína marcador, una proteína de interés terapéutico o de

interés vacunal, sin limitarse a estos tipos. Preferentemente, la proteína de interés es una proteína antigénica.

[0043] Además, la proteína de interés puede ser una proteína de fusión. Por ejemplo, puede tratarse de una construcción que contenga la GFP fusionada en fase, a su extremo C-terminal, con una proteína de interés, en la que la GFP esté fusionada a su vez en fase C-terminal de la proteína N (es decir, una proteína de fusión proteína N-GFP-proteína de interés).

[0044] Preferentemente, la construcción N-GFP-proteína de interés puede incluir una secuencia de unión entre las proteínas N y GFP con la secuencia KLRILQSTVPSERPQASGVYMGNLTRGPVAT (SEQ ID NO: 32) lo que permite una optimización del rendimiento de producción de la proteína de fusión N-GFP (ver ejemplo 6) y por tanto de la proteína de fusión N-GFP-proteína de interés.

[0045] La proteína de interés puede ser en concreto una proteína de fusión GFP-proteína antigénica o GFP-proteína de interés terapéutico. También puede tratarse igualmente de una proteína quimera que contenga una «secuencia de unión» fusionada con la proteína de interés. La secuencia de unión es un polipéptido que contiene típicamente hasta 30 aminoácidos, preferentemente hasta 20 aminoácidos, más preferentemente aún hasta 10 aminoácidos, y que tiene una función de espaciador entre la proteína N y la proteína de interés, lo que permite que cada una de esas proteínas se multiplique correctamente.

[0046] Así, según un modo de realización, la proteína de interés es un antígeno y la proteína de fusión según la invención es una fusión proteína N-antígeno («N-Ag»). Preferentemente, se trata de una proteína de fusión de la proteína N del RSV humano o bovino con una proteína antigénica.

[0047] Como se ha descrito aquí, la proteína de interés puede ser una proteína de interés terapéutico y la proteína de fusión descrita aquí puede ser una fusión proteína N-proteína de interés terapéutico. Preferentemente, se trata de una proteína de fusión de la proteína N del RSV humano o bovino con una proteína de interés terapéutico.

[0048] Ventajosamente, se puede fusionar un marcador (como un marcador histidina) al extremo N-terminal de la proteína N de forma que facilite la purificación de las proteínas de fusión proteína N-proteína de interés.

[0049] Alternativamente, la purificación de las proteínas de fusión proteína N-proteína de interés puede realizarse coexpresando dicha proteína de fusión con una proteína P del virus *Paramyxoviridae*, en concreto una proteína P fusionada con la GST, como se explicará más adelante.

[0050] Para producir las proteínas de fusión según la invención se puede usar cualquier técnica convencional de biología molecular, de microbiología o de ADN recombinado. Dichas técnicas están al alcance del experto en la materia, y aparecen descritas en concreto en Sambrook, Fritsch&Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York («Sambrook et al., 1989»); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription and Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells and Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. 1994.

[0051] La solicitud describe asimismo los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión proteína N-proteína de interés mencionada anteriormente.

[0052] Una «secuencia codificadora» indica una secuencia nucleotídica que, cuando se expresa, da como resultado la producción de un ARN, de un polipéptido, de una proteína, etc. Una secuencia codificadora de una proteína contiene generalmente un codón iniciador (ATG) y un codón finalizador.

[0053] «Expresar» o «expresión» significa permitir o conseguir que se manifieste la información contenida en un gen o una secuencia de ADN, por ejemplo, produciendo una proteína por activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción de la secuencia genética o de ADN correspondiente. Se habla de «coexpresión» cuando la información contenida en dos genes o secuencias de ADN está expresada en una misma célula anfitriona celular.

[0054] La solicitud describe por tanto ácidos nucleicos (ADNc, ADN genómico, sintético, o ARN) que codifican las proteínas de fusión proteína de N-proteína de interés. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario (es decir una hebra codificante o no codificante). Los ácidos nucleicos no se limitan a la secuencia que codifica la proteína de fusión y pueden incluir secuencias codificantes o no codificantes antes o después de la secuencia que

codifica la proteína de fusión.

[0055] La secuencia codificante de la proteína de fusión aquí descrita es una secuencia híbrida o quimera que contenga al menos dos partes, consecutivamente en el sentido 5'-3', una parte que codifica la proteína N y una parte del lado 3' que codifica la proteína de interés. Cuando la proteína de interés es a su vez una fusión o cuando un marcador está unido a la proteína N, la secuencia codificante contiene el número adecuado de partes. Entre cada una de las partes, los codones pueden codificar una secuencia de unión.

[0056] La solicitud describe asimismo los vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión proteína N-proteína de interés. Dichos vectores pueden contener un elemento regulador de la transcripción funcionalmente unido con el ADN.

[0057] Una secuencia codificante está «funcionalmente unida con» secuencias de control de transcripción y de traducción cuando un ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARN, en concreto en ARNm, que después se puede cortar y empalmar si contiene intrones, y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

[0058] Las expresiones «vector», «vector de clonación» y «vector de expresión» designan el vehículo por el cual una secuencia de ADN o de ARN (por ejemplo un gen heterólogo) puede introducirse en una célula anfitriona de forma que transforme la célula anfitriona y facilite la expresión de la secuencia introducida. Algunos ejemplos de vectores incluyen los plásmidos, los fagos, los virus. Los vectores más comunes son los plásmidos, que son unidades de multiplicación autónomas, en general de origen bacteriano, y que pueden tener forma de ADN bicatenario. Los plásmidos pueden integrar fácilmente una secuencia de ADN exógena, que entonces puede introducirse fácilmente en un anfitrión apropiado. Un vector plasmídico contiene generalmente una secuencia de ADN codificante, una secuencia de ADN promotora y presenta una o varias secuencias de restricción que permiten introducir un ADN exógeno. Algunos ejemplos no limitativos de plásmidos incluyen los plásmidos pKK (Clonotech), pUC y pET (Novagen, Inc., Madison, WI), pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), o pGEX-4T-3 (Pharmacia).

[0059] Asimismo, se describen células anfitrionas que contienen los vectores de expresión. Estas células anfitrionas se «transforman» con dichos vectores.

[0060] Por «célula anfitriona» se entiende cualquier célula que se seleccione, modifique, cultive o manipule, para la producción de una sustancia a través de la célula, por ejemplo la expresión a través de la célula de un gen, de una secuencia de ADN o de ARN, de una proteína o de una enzima.

[0061] Un «sistema de expresión» designa una célula anfitriona y un vector compatible utilizados en condiciones apropiadas para producir una proteína codificada por un ADN exógeno transportado por el vector e introducido en la célula anfitriona. Los sistemas de expresión habituales incluyen células anfitrionas *E. coli* y vectores plasmídicos, células de insecto y vectores Baculovirus o incluso células de mamífero y vectores con activadores fuertes de origen vírico (por ejemplo citomegalovirus).

[0062] Ventajosamente, el sistema de expresión que se describe aquí es un sistema de expresión bacteriano, en particular en el *E. coli*, con un vector pGEX-4T-3, por ejemplo. Los sistemas bacterianos son sistemas de expresión que permiten generalmente obtener los rendimientos de producción más elevados.

[0063] Por tanto, la solicitud describe igualmente un procedimiento de producción de una proteína de fusión proteína N-proteína de interés como la que se ha definido más arriba que consiste, eventualmente, en la transformación de una célula anfitriona y a continuación del cultivo de la célula anfitriona transformada con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión proteína N-proteína de interés en condiciones que permiten la expresión de proteínas de fusión proteína N-proteína de interés, y eventualmente, la purificación de las proteínas de fusión proteína N-proteína de interés expresadas. Las condiciones de cultivo dependen del sistema de expresión elegido, (es decir, célula anfitriona y vector) y la determinación de dichas condiciones está al alcance del experto en la materia.

[0064] *Procedimiento de preparación del complejo proteína N-proteína de interés/proteína P* Los Inventores han demostrado anteriormente que la proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae* puede producirse en un sistema de coexpresión con la proteína P del mismo virus de la familia de los *Paramyxoviridae*. Este mismo sistema puede utilizarse para expresar la proteína de fusión proteína N-proteína de interés en forma de un complejo con la proteína P, y después, eventualmente, purificar la proteína de fusión a partir de este complejo.

[0065] La solicitud describe un procedimiento de preparación de un complejo proteína N-proteína de

interés/proteína P, las proteínas N y P son proteínas de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*, dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

- 5 a) coexpresar una proteína de fusión proteína N de un virus de la familia *Paramyxoviridae*-proteína de interés, en la que la proteína de interés está fusionada en fase al extremo C-terminal de la proteína N, con una proteína P del mismo virus de la familia *Paramyxoviridae*;
 b) recoger los complejos proteína N-proteína de interés/proteína P que se formen de este modo.

10 **[0066]** Como se ha especificado anteriormente, la proteína N puede llevar, en su extremo N-terminal un marcador como un marcador histidina. Además, la proteína de interés puede ser a su vez una construcción de fusión.

15 **[0067]** Además, como se ha descrito más arriba, la proteína N puede ser una proteína N nativa, o, haber sido modificada en la región definida por los 25, preferentemente los 20, 15, 10 o 5 últimos aminoácidos C-terminales, a condición de que la proteína N modificada conserve la capacidad de interactuar con la proteína P. Estas modificaciones consisten típicamente en una supresión, sustitución y/o inserción de uno o varios aminoácidos (por ejemplo de 1 a 25, o 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o incluso 1 a 5 aminoácidos contiguos o no) en la secuencia C-terminal de la proteína N. Un ejemplo de modificación de secuencia de la proteína N puede consistir en una supresión de los 6 o 12 aminoácidos C-terminales, donde dichas proteínas N truncadas (NΔ6C y NΔ12C) siguen siendo capaces de
 20 interactuar con la proteína P.

25 **[0068]** Preferentemente, dicha proteína P es una proteína P truncada («PΔ») que no contiene el dominio de oligomerización P y que presenta un dominio de unión con la proteína N. Los Inventores han demostrado anteriormente que esta forma de realización permitía expresar una gran cantidad de complejos N-P en forma soluble (solicitud de patente FR 2885139). La solubilidad se determina por centrifugado durante 30 minutos a 10 000 x g en un medio acuoso, sin detergentes, por ejemplo, una solución salina como PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) o una solución amortiguadora Tris 10 mM pH 7,4, 150 mM NaCl.

30 **[0069]** La expresión «proteína P truncada» designa una proteína P en la que una o varias secuencias de aminoácidos contiguos se han suprimido. Se puede tratar del truncamiento de una secuencia C-terminal, de una secuencia N-terminal, de una secuencia «interna» respecto de la estructura primaria de la proteína P, o de una combinación de esos truncamientos.

35 **[0070]** La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P, las proteínas N y P son proteínas de un virus respiratorio sincicial (RSV), dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

- 40 a) coexpresar una proteína de fusión proteína N de un virus respiratorio sincicial -proteína de interés, con una proteína P truncada del mismo virus respiratorio sincicial, en la que la proteína de interés N se fusiona en fase al extremo C-terminal de la proteína N, donde la proteína N es una proteína nativa o una proteína N modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, dicha proteína N conserva la capacidad de interactuar con la proteína P, y donde la proteína P truncada no contiene el dominio de oligomerización y contiene un dominio de unión a la proteína N;
 b) recoger los complejos proteína N-proteína de interés/proteína P que se formen de este modo.

45 **[0071]** Las proteínas P truncadas según la invención no contienen el dominio de oligomerización P y son capaces de interactuar con la proteína N, es decir, que presentan un dominio de unión a la proteína N. Como el dominio de interacción de la proteína P de los *Paramyxoviridae* con la proteína N se ha cartografiado en el extremo C-terminal, algunos ejemplos de proteína P truncada incluyen preferentemente un fragmento C-terminal de la proteína P, o una proteína P «quimera» formada por la fusión de un fragmento C-terminal de la proteína P (capaz de interactuar con la proteína N) con al menos otra secuencia de aminoácidos contiguos de la proteína P. Este fragmento C-terminal y esta otra secuencia de la proteína P no son naturalmente contiguos, y no presentan ensamblaje de secuencia entre ellos. Por ejemplo, una proteína P truncada del RSV puede tener la secuencia formada por los aminoácidos 1 a 121 y 161 a 241 de la proteína P nativa. Un «fragmento» de un polipéptido de
 55 referencia designa cualquier secuencia de aminoácidos contiguos que se encuentren en la secuencia del polipéptido de referencia.

60 **[0072]** Por «fragmento C-terminal de la proteína P» o «PΔN» se entiende una proteína P en la que uno o varios aminoácidos consecutivos se han suprimido a partir del extremo N-terminal. Preferentemente, un fragmento C-terminal de la proteína P designa un encadenamiento de aminoácidos posicionados en la mitad C-terminal de la estructura primaria de la proteína P (cuando el número de aminoácidos de la secuencia es impar, se puede atribuir arbitrariamente un aminoácido adicional a la mitad C-terminal de la proteína respecto de la mitad N-terminal). Por

ejemplo, en la proteína P del RSV que contiene 241 aminoácidos, PΔ161N designa un fragmento C-terminal constituido por los aminoácidos 161 a 241 de la proteína P. Asimismo, por ejemplo, en la proteína P del virus del sarampión (cepa Edmonston B) que contiene 507 aminoácidos, PΔ386N designa un fragmento C-terminal formado por los aminoácidos 386 a 507 de la proteína P.

5

[0073] Cuando la proteína P truncada es un fragmento C-terminal de la proteína P, se describe un procedimiento de preparación de un complejo soluble proteína N-proteína de interés/fragmento C-terminal de la proteína P («complejo NPI/PΔN») de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*, dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

10

a) coexpresar una proteína N de un virus de la familia *Paramyxoviridae*, fusionada en fase a su extremo C-terminal con una proteína de interés, con un fragmento C-terminal de la proteína P del mismo virus de la familia de los *Paramyxoviridae*, dicho fragmento C-terminal de la proteína P no contiene el dominio de oligomerización P y es capaz de interactuar con la proteína de fusión N-proteína de interés;

15

b) recoger los complejos solubles N-PI/PΔN que se formen de este modo.

[0074] Dicho virus de la familia de los *Paramyxoviridae* puede ser un *Paramyxovirinae* o un *Pneumovirinae*. En concreto, el virus puede seleccionarse dentro del grupo formado por el virus de las paperas, el virus del sarampión, el *Metapneumovirus* humano, el virus paragripal y el virus respiratorio sincicial. Preferentemente, el virus es un *Pneumovirus*, como el virus respiratorio sincicial (RSV), humano o bovino. Según la invención, el virus es un virus respiratorio sincicial (RSV), humano o bovino.

20

[0075] El experto en la materia conoce o es capaz de determinar las proteínas P truncadas, o más concretamente los fragmentos C-terminales de la proteína P, que son capaces de interactuar con la proteína de fusión antígeno-proteína N.

25

[0076] Por ejemplo, la estrategia de coexpresión de las proteínas N y P en el *E. coli* descrita por Castagné et al. (2004, Journal of General Virology; 85: 1643-1653) se puede utilizar para cartografiar el dominio de interacción entre P y N. Los Inventores han demostrado así que los fragmentos C-terminales de la proteína P del RSV que contienen un oligopéptido formado por los 9 aminoácidos C-terminales de la proteína P (aminoácidos 233 a 241), son capaces de interactuar con la proteína N.

30

[0077] Por otro lado se ha descrito, por ejemplo, que el dominio de interacción de la proteína P del virus de Sendai, con la proteína N en forma de complejo ARN-N o ribonucleoproteína (RNP), llamado «X-domain» o XD está definido por los aminoácidos 473 a 568 (Kolakofsky et al., 2004; Virology; 318(2):463-73).

35

[0078] Los Inventores han demostrado, asimismo, que ciertos fragmentos C-terminales de la proteína P del RSV, en concreto el fragmento PΔ161N (aminoácidos 161 a 241), permitían preparar grandes cantidades de proteína N, comparativamente con la proteína P entera que, en la práctica, no permite obtener rendimientos suficientes a escala industrial. Los mutantes de eliminación más pequeños, hasta PΔ233N (aminoácidos 233 a 241) que no contienen más de 9 aminoácidos, permiten obtener rendimientos comparables a los de PΔ161N.

40

[0079] Estos fragmentos más pequeños que PΔ161N corresponden a fragmentos de la proteína del RSV capaces de interactuar con la proteína N y que ya no tienen capacidad de oligomerización, y por tanto, ya no contienen el dominio de oligomerización P. El dominio mínimo de oligomerización P del RSV se define por los aminoácidos 120 a 150 de la proteína P.

45

[0080] Esta misma estrategia ha permitido a los inventores demostrar que un fragmento C-terminal de la proteína P del virus del sarampión, formado por los residuos de aminoácidos 386-507 (PΔ386N), interactuaba con la proteína N de dicho virus y permitía su purificación. Sin embargo, una eliminación de la parte N-terminal de la proteína P, hasta el residuo 456 (incluido; fragmento PΔ457N), no permite purificar la proteína N. La estructura de la región C-terminal de la proteína P que interactúa con la ribonucleocápside ha sido determinada por Johansson et al. (2003 Journal of Biological Chemistry vol. 278 p 44567-44573). La región de oligomerización P ha sido determinada por eliminación y predicción como está definida por los aminoácidos 304-376.

50

[0081] El uso de fragmentos C-terminales de la proteína P que contienen el dominio de interacción con la proteína N en forma de RNP pero en los que el dominio de oligomerización P se ha eliminado permite por tanto la interacción de los fragmentos de la proteína P con la proteína N, la formación de complejos solubles N-PΔN, y la producción de estos complejos con un rendimiento elevado. Sin querer limitarse a un mecanismo particular, se supone que la ausencia del dominio de oligomerización P evita problemas de insolubilidad de los complejos N-ΔPN vinculados a las interacciones entre las proteína P de esos complejos.

60

[0082] Así, como se ha descrito aquí, el procedimiento de preparación del complejo N-PI-PΔN implica la expresión de un fragmento C-terminal de la proteína P del RSV que comprende los 9 últimos aminoácidos C-terminales de la proteína P del RSV y que está desprovisto al menos de los 119, preferentemente, de los 149, y más preferentemente todavía de los 160 aminoácidos N-terminales de la proteína P del RSV.

5

[0083] Más específicamente, en el procedimiento descrito se puede coexpresar con la proteína de fusión proteína N-proteína de interés del RSV:

a) un fragmento C-terminal de la proteína P del RSV que presenta la secuencia de aminoácidos 233 a 241 de la proteína P del RSV humano cepa LONG como se ha mostrado en la SEQ ID NO: 1, y que se extiende en dirección N-terminal hasta un residuo de aminoácido comprendido entre las posiciones 233 y 120, preferentemente 150, más preferentemente todavía 161, de la secuencia de la proteína P del RSV como se muestra en SEQ ID NO: 1, o

b) un fragmento C-terminal, homólogo del fragmento definido en a), de una proteína P derivada de otra cepa del RSV humano o de una cepa del RSV bovino.

15

[0084] El fragmento C-terminal de la proteína P del RSV puede, por ejemplo, seleccionarse dentro del grupo constituido por PΔ120N (aminoácidos 120 a 241 de P), PΔ150N (aminoácidos 150 a 241 de P), PΔ161N (aminoácidos 161 a 241 de P), PΔ180N (aminoácidos 180 a 241 de P), PΔ200N (aminoácidos 200 a 241 de P), PΔ220N (aminoácidos 220 a 241 de P), PΔ230N (aminoácidos 230 a 241 de P) y PΔ233N (aminoácidos 233 a 241 de P).

20

[0085] La descripción se refiere igualmente a un procedimiento en el que se coexpresa, con la proteína de fusión proteína N-proteína de interés del RSV, una proteína P truncada que contiene un fragmento C-terminal de la proteína P del RSV como se ha descrito anteriormente, que contiene los 9 últimos aminoácidos C-terminales de la proteína del RSV y que está desprovisto al menos de los 119, preferentemente de los 149, más preferentemente todavía de los 160 aminoácidos N-terminales de la proteína P del RSV.

25

[0086] Por ejemplo, la proteína P truncada que consta de un fragmento C-terminal de la proteína P puede estar formada por la fusión de los 122 últimos aminoácidos N-terminales con los 80 últimos aminoácidos C-terminales de la proteína P del RSV; por ejemplo, puede estar formada por el encadenamiento de los aminoácidos 1 a 121 y 161 a 241 de la proteína P del RSV humano cepa LONG como se ha mostrado en la SEQ ID NO: 7.

30

[0087] Como se ha descrito aquí, el *Paramyxoviridae* puede ser el virus del sarampión, y el procedimiento de preparación del complejo N-PI-PΔN puede implicar la expresión de un fragmento C-terminal de la proteína P del virus del sarampión que contenga como máximo los 122 últimos aminoácidos C-terminales de la proteína P o que esté constituido por estos. En concreto, puede tratarse de un fragmento C-terminal constituido por los ácidos 386 a 507 de la proteína P (PΔ386N) del virus del sarampión cepa Edmonston B, como se muestra en la SEQ ID NO: 10, o de un fragmento C-terminal, homólogo al definido para la proteína P de la cepa Edmonston, de una proteína P salida de otra cepa del virus del sarampión.

35

[0088] En el contexto de la invención, el término «homólogo» se refiere a la relación existente entre proteínas que poseen un mismo origen evolutivo, por ejemplo, proteínas homólogas que pertenezcan a diferentes especies, o en el caso de los virus, cepas víricas. Dichas proteínas (y sus genes codificantes), presentan homologías de secuencia, reflejadas por la similitud de secuencias, ya sea en términos de porcentaje o de similitud o en términos de presencia de residuos o de motivos específicos a nivel de posiciones conservadas.

45

[0089] La expresión «similitud de secuencias» designa el grado de semejanza entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos de proteínas que pueden compartir o no un mismo origen evolutivo. Habitualmente, se utilizan indistintamente los términos homología o similitud. Dos secuencias de aminoácidos son «esencialmente homólogas» cuando sus aminoácidos son idénticos en al menos un 80 %, o similares (es decir, funcionalmente idénticos) en al menos un 90 %. Se pueden identificar secuencias similares u homólogas por alineación, utilizando por ejemplo los programa BLAST o FASTA.

50

[0090] Como se ha descrito aquí, la proteína P, por ejemplo la proteína P truncada y en concreto el fragmento C-terminal de la proteína P, puede expresarse en forma de fusión con una proteína que facilite la purificación de los complejos N-proteína de interés/proteína P, en concreto, una proteína utilizable en cromatografía de afinidad. Puede tratarse de una proteína marcador como la glutatión-S-transferasa (GST), en cuyo caso la proteína de fusión proteína P-GST puede ser aislada por cromatografía sobre un soporte sólido acoplado a la glutatión. Se pueden utilizar otros marcadores o «Tag» como la polihistidina o «His-Tag».

60

[0091] Ventajosamente, según el procedimiento de preparación de la invención, la proteína P truncada se expresa en forma de fusión con una proteína que facilite la purificación de los complejos N-proteína de

interés/proteína P.

5 **[0092]** Así se obtienen complejos de proteína N-proteína de interés/proteína P-proteína marcador (GST u otra proteína marcador en fusión con la proteína P), en los que la proteína marcador puede eliminarse por descomposición enzimática. Por ejemplo, la GST se puede eliminar por descomposición con trombina o con cualquier otra enzima apropiada cuando la fusión contiene una proteína diferente a la GST.

10 **[0093]** A continuación se describen ejemplos específicos de construcción de vectores que permiten utilizar el procedimiento según la invención.

10 **[0094]** Según un modelo descrito aquí, la proteína de interés es un antígeno y el procedimiento según la invención conduce a la formación de complejos solubles proteína N-antígeno/proteína P (complejo N-Ag/P), preferentemente proteína N-antígeno/proteína P truncada (complejo N-Ag/PΔ) y más preferentemente aún proteína N-antígeno/fragmento C-terminal de la proteína P (N-Ag/PΔN).

15 *Separación de las proteína de fusión a partir de complejos proteína N-proteína de interés/proteína P*

20 **[0095]** El procedimiento de preparación de un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P, en el que la proteína P puede estar truncada y ser en concreto un fragmento C-terminal de la proteína P, como se ha descrito anteriormente, permite obtener fácilmente complejos de proteína N-proteína de interés/proteína P en forma aislada o purificada.

25 **[0096]** La demanda describe igualmente un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P, en el que las proteínas N y P son proteínas de un virus de la familia *Paramyxoviridae*, susceptibles de ser obtenidas por un procedimiento de preparación como el que se ha descrito más arriba.

30 **[0097]** La invención se refiere a un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P en forma de anillos solubles que contienen la proteína de fusión proteína N-proteína de interés con su ARN, las proteínas N y P son proteínas de un virus respiratorio sincicial, en el que la proteína de interés se fusiona en fase al extremo C-terminal de la proteína N, donde la proteína N es una proteína nativa o una proteína N modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, dicha proteína N conserva la capacidad de interactuar con la proteína P, y la proteína P es una proteína P truncada del mismo virus respiratorio sincicial que no contiene el dominio de oligomerización P y contiene un dominio de unión a la proteína N. En un modo concreto, la proteína de interés del complejo según la invención es una proteína marcador, o una proteína de interés vacunal. La proteína de interés
35 vacunal puede ser un antígeno derivado de un microorganismo patógeno. En una variante, la proteína de interés es una construcción que contiene la GFP (Green Fluorescent Protein) fusionada en fase, en su extremo C-terminal, con una proteína vacunal.

40 **[0098]** En concreto, la invención se refiere a un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P como el que se ha descrito anteriormente, en el que la proteína de fusión proteína N-proteína de interés es una proteína de fusión N-GFP-proteína de interés que contiene la GFP (Green Fluorescent Protein) fusionada en fase al extremo C-terminal de la proteína N, que incluye una secuencia de unión entre las proteína N y GFP que tiene la secuencia SED ID NO: 32.

45 **[0099]** En concreto, se describe un complejo soluble proteína N-proteína de interés/proteína P truncada (complejo NPI/PΔ), y más específicamente un complejo soluble proteína N-proteína de interés/fragmento C-terminal de la proteína P (complejo NPI/PΔN), donde las proteínas N y P son proteínas de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*.

50 **[0100]** A partir de estos complejos proteína N-proteína de interés/proteína P, o más específicamente N-PI/PΔ o N-PI/PΔN, la proteína de fusión proteína N-proteína de interés puede aislarse fácilmente en forma de anillos, con su ARN, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño (gel filtration). Esta separación puede llevarse a cabo, en su caso, después de la separación, por descomposición enzimática de la proteína P y de la proteína marcador a la que la proteína P se fusiona eventualmente.

55 **[0101]** Además, se describe un procedimiento de preparación de proteínas de fusión N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae* - proteína de interés, dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

60 a) preparar un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P por un procedimiento como el que se ha definido más arriba; y

b) separar las proteínas de fusión proteína N-proteína de interés de los complejos proteína N-proteína de interés/proteína P.

[0102] Por tanto, la invención se refiere además a un procedimiento de preparación de una proteína N de un virus respiratorio sincicial, fusionado en fase a su extremo C-terminal con una proteína de interés, dicho procedimiento consiste en la separación de la proteína de fusión proteína N-proteína de interés a partir del complejo
5 proteína N-proteína de interés/proteína P según la invención.

[0103] La proteína P es una proteína truncada, preferentemente un fragmento C-terminal de la proteína P.

[0104] Más concretamente se describe un procedimiento de preparación de proteínas de fusión solubles
10 proteína N-proteína de interés de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*, dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

a) preparar un complejo soluble proteína N-proteína de interés/fragmento C-terminal de la proteína P (complejo NPI/PΔN) por un procedimiento como el que se ha definido más arriba; y

15 b) separar las proteínas de fusión proteína N-proteína de interés de los complejos solubles N-PI/PΔN.

[0105] Como se ha descrito más arriba, la proteína N puede ser una proteína N nativa, o, haber sido modificada en la región definida por los 25, preferentemente los 20, 15, 10 o 5 últimos aminoácidos C-terminales, a condición de que la proteína N modificada conserve la capacidad de interactuar con la proteína P. Estas
20 modificaciones consisten típicamente en una supresión, sustitución y/o inserción de uno o varios aminoácidos (por ejemplo de 1 a 25, o 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o incluso 1 a 5 aminoácidos contiguos o no) en la secuencia C-terminal de la proteína N. Un ejemplo de modificación de secuencia de la proteína N puede consistir en una supresión de los 6 o 12 aminoácidos C-terminales, dichas proteínas truncadas (NΔ6C y NΔ12C) siguen siendo todavía capaces de interactuar con la proteína P.

25

[0106] Se describen igualmente las proteínas de fusión proteína N-proteína de interés susceptibles de ser obtenidas por el procedimiento anterior.

[0107] La invención se refiere a una proteína de fusión proteína N-proteína de interés aislada, estructurada
30 en anillos solubles formada por la proteína de fusión proteína N-proteína de interés con su ARN, que puede obtenerse por el procedimiento de preparación de una proteína N de un virus respiratorio sincicial según la invención, donde la proteína N es una proteína N de un virus respiratorio sincicial nativa o modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, y la proteína de interés se fusiona en fase, en C-terminal de la proteína N.

35

[0108] La proteína de interés puede ser una proteína de interés terapéutico o vacunal. Preferentemente, la proteína de interés es un antígeno.

Composiciones inmunógenas, vacunales o terapéuticas

40

[0109] Anteriormente, los Inventores han mostrado que la proteína N del RSV estructurada en anillos, aislada o en forma de complejo proteína N-fragmento C-terminal de la proteína P (N-PΔN), es altamente inmunógena, y que permite, en concreto, estimular una respuesta local, por ejemplo, a nivel de la mucosa respiratoria.

45 **[0110]** Ahora, los Inventores han demostrado que estas estructuras en anillos pueden utilizarse como vector de proteínas terapéuticas o vacunales.

[0111] El uso de una proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae* como vector de moléculas o proteínas de interés terapéutico o vacunal está descrito.

50

[0112] Como se describe aquí, una proteína terapéutica o vacunal se fusiona con la proteína N, como se ha descrito más arriba.

[0113] Como se describe aquí, una molécula terapéutica o vacunal puede acoplarse químicamente a la
55 proteína N. Así, añadiendo una cisteína a C-terminal de la proteína N, se crea una secuencia que permite acoplar químicamente diversas moléculas de naturaleza proteínica o no proteínica (orgánica o mineral). Se puede injertar una proteína que también transporte una cisteína por puente disulfuro. De este modo, la maleimida acoplada a diversas moléculas injertarse en esta cisteína por unión covalente. La maleimida puede acoplarse a cualquier tipo de molécula orgánica, como el dextrón, la biotina, el oro o cualquier proteína.

60

[0114] Por ello, también se describe un conjugado de la proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae* con una molécula de interés, en concreto una molécula terapéutica o vacunal.

[0115] Asimismo se ha descrito un procedimiento de administración de una molécula o proteína terapéutica o vacunal a un sujeto, que consta de la administración de dicha molécula terapéutica o vacunal unida de forma covalente a una proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae* con dicho sujeto, o que conste de la administración de dicha proteína en forma de una proteína de fusión con la proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*, estando la proteína terapéutica o vacunal fusionada en fase, en C-terminal de proteína N.

[0116] Igualmente se describe una composición farmacéutica, que contiene una proteína de fusión proteína N-proteína de interés, eventualmente en forma de complejo proteína N-proteína de interés/proteína P, donde las proteínas N y P son proteínas de un mismo virus de la familia de los *Paramyxoviridae*, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0117] La invención propone una composición farmacéutica que presenta una proteína N de un virus respiratorio sincicial fusionado con una proteína de interés según la invención o un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0118] Dicho virus de la familia de los *Paramyxoviridae* puede ser un *Paramyxovirinae* o un *Pneumovirinae*. En concreto, el virus puede seleccionarse dentro del grupo formado por el virus de las paperas, el virus del sarampión y el virus paragripal. Preferentemente, el virus es un *Pneumovirus*, en concreto, el virus respiratorio sincicial (RSV), por ejemplo humano o bovino.

[0119] La proteína de interés puede ser una proteína de interés terapéutico o vacunal.

[0120] Como se ha descrito aquí, la composición farmacéutica está adaptada a un uso terapéutico. Según este ejemplo ajeno a la invención, la proteína de interés es una proteína de interés terapéutico. Efectivamente, los Inventores han determinado que la proteína de fusión proteína N-proteína de interés penetra en las células y que la proteína N constituye por tanto a estos efectos un vector potencial para las moléculas o proteínas de interés terapéutico, como por ejemplo un polipéptido antiangiogénico o proapoptótico.

[0121] Según un modo de realización, la composición farmacéutica está adaptada a un uso inmunógeno o vacunal. Según este modo de realización, la proteína de interés es una proteína antigénica, preferentemente un antígeno derivado de un microorganismo patógeno, como un virus, una bacteria, un hongo o un organismo metazoico o protozoico parásito.

[0122] Efectivamente, los Inventores han mostrado que la respuesta de un anfitrión ante un antígeno aumenta muy significativamente cuando este antígeno se presenta en forma de proteína de fusión con la proteína N. Las proteínas de fusión proteína N-antígeno son capaces de estimular la respuesta inmunitaria tanto por vía celular o como humoral.

[0123] Las proteínas de fusión solubles proteína N-antígeno pueden utilizarse para la vacunación en forma de complejo con la proteína P sin efecto desfavorable. Consecuentemente, una composición inmunógena o vacunal según la invención puede contener un complejo soluble proteína N-antígeno/proteína P, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0124] Por «vehículo farmacéuticamente aceptable» se entiende cualquier disolvente, medio de dispersión, agentes retardantes de la absorción, etc que no produzca efectos secundarios, por ejemplo, alérgicos en los humanos o animales.

[0125] El experto en la materia conoce ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables. Algunos ejemplos de vehículos líquidos incluyen soluciones acuosas estériles que no contienen ningún otro material más que los activos y agua, o que contienen una solución amortiguadora como el fosfato de sodio con un valor de pH fisiológico, con una salinidad fisiológica, o con los dos como una solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Los vehículos acuosos pueden contener más de una sal amortiguadora, incluso sales como el cloruro de sodio o potasio, dextrosa, polietilenglicol y otras soluciones.

[0126] Las composiciones se administran de forma compatible con la formulación galénica y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se debe administrar depende del sujeto que se va a tratar, de la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el principio activo, y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de proteína de fusión necesarias para la administración dependen de la elección del sanitario y de las particularidades de cada individuo.

[0127] Ventajosamente, cuando la composición farmacéutica es una composición inmunógena o vacunal,

puede incluir un adyuvante. Un «adyuvante» designa un producto que aumenta, estimula, activa, refuerza o modula la reacción inmunitaria a nivel celular o humoral dirigida contra un antígeno administrado simultáneamente. Algunos ejemplos de adyuvantes clásicos incluyen adyuvantes que contienen antígenos bacterianos, como el adyuvante completo de Freund, el LPS y sus derivados, las toxinas bacterianas (toxina colérica y enterotoxina) y sus mutantes 5 destoxificados (por ejemplo LT(R192G)), secuencias oligonucleótidas que contienen motivos CpG, adyuvantes minerales como el hidróxido de aluminio (Alum), el fosfato de calcio o el fosfato de potasio, emulsiones aceitosas y agentes emulsionantes (saponinas, por ejemplo QS21), citocinas.

10 **[0128]** Las composiciones inmunógenas según la invención permiten inducir una respuesta inmunitaria contra el antígeno en el sujeto vacunado, o más específicamente contra el patógeno del que se deriva el antígeno.

[0129] Las composiciones vacunales según la invención permiten conferir una protección ante una infección por un patógeno que contenga el antígeno, es decir, una reducción de la gravedad de los efectos de esa infección respecto de un sujeto no inmunizado con la composición vacunal.

15 **[0130]** Se describe igualmente el uso de una composición vacunal, como la que se ha definido más arriba, en un procedimiento de vacunación contra el patógeno del que deriva el antígeno.

[0131] La demanda describe igualmente un procedimiento de vacunación que contiene al menos una 20 administración de una composición vacunal a un sujeto. Preferentemente, el procedimiento de vacunación presenta una primera administración a un sujeto de una composición vacunal, y al menos una administración de recuerdo de dicha composición vacunal al mismo sujeto. Las administraciones de recuerdo, que vuelven a exponer al paciente al antígeno, inducen una respuesta inmunitaria secundaria más fuerte.

25 **[0132]** La composición vacunal se administra ventajosamente en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica ante una infección por el patógeno del que deriva el antígeno. Naturalmente, la posología depende del activo considerado, del modo de administración, de la edad del sujeto y de su estado. La cantidad de complejo N-Ag-P, N-Ag-PΔ, o N-Ag-PΔN, o de proteína de fusión N-Ag por dosis puede encontrarse entre 0,1 y 200 μg, y preferentemente entre 10 y 100 μg por dosis vacunal.

30 **[0133]** La composición farmacéutica, inmunógena o vacunal puede administrarse por cualquier vía, en concreto por vía mucosa (por ejemplo ocular, intranasal u oral), o por vía parenteral (por ejemplo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal).

35 **[0134]** La expresión «sujeto» designa un humano o un animal no humano, por ejemplo un pájaro o un mamífero como un bóvido, un óvido, un roedor, un cánido en concreto un perro, un felido en concreto un gato, un cerdo, un mono expuesto o susceptible de estar expuesto a una infección por un virus *Paramyxoviridae* o por cualquier otra patología. Preferentemente, el sujeto en el sentido de la invención es un humano o un bóvido.

40 **[0135]** Para cada uno de estos aspectos, y como se ha descrito más arriba, la proteína N puede ser una proteína N nativa, o, haber sido modificada en la región definida por los 25, preferentemente los 20, 15, 10 o 5 últimos aminoácidos C-terminales, a condición de que la proteína N modificada conserve la capacidad de interactuar con la proteína P. Estas modificaciones consisten típicamente en una supresión, sustitución y/o inserción de uno o 45 varios aminoácidos (por ejemplo de 1 a 25, o 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o incluso 1 a 5 aminoácidos contiguos o no) en la secuencia C-terminal de la proteína N. Un ejemplo de modificación de secuencia de la proteína N puede consistir en una supresión de los 6 o 12 aminoácidos C-terminales, dichas proteínas truncadas (NΔ6C y NΔ12C) siguen siendo todavía capaces de interactuar con la proteína P.

Aplicaciones diagnósticas

50 **[0136]** La fusión de un antígeno que presente al menos un epítipo con la proteína N de un virus de la familia *Paramyxoviridae* constituye además un reactivo susceptible de ser utilizado en aplicaciones diagnósticas para la detección de anticuerpos dirigidos contra al menos uno de dichos epítopos transportados por la proteína de fusión.

55 **[0137]** Se describe un reactivo diagnóstico que contiene una proteína de fusión proteína N-antígeno que contiene un antígeno fusionado en fase C-terminal de una proteína N de un virus de la familia *Paramyxoviridae* como la que se ha descrito más arriba.

60 **[0138]** Por tanto, la invención se refiere además a un reactivo diagnóstico que contiene una proteína de fusión según la invención, en la que la proteína de interés es un antígeno.

[0139] Se describe igualmente un equipo diagnóstico que contiene dicho reactivo y los medios de detección

apropiados.

[0140] Dicho antígeno presenta al menos un epítopo, y puede comprender igualmente dos o más de dos epítopos idénticos o diferentes.

5

[0141] También se describe el uso de una proteína de fusión proteína N-antígeno para la detección, in vitro o in vivo, de anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno de la proteína de fusión.

[0142] La invención propone igualmente la utilización de una proteína de fusión según la invención que contiene un antígeno fusionado en fase en C-terminal de una proteína N de un virus respiratorio sincicial para la detección in vitro de anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno de la proteína de fusión.

10

[0143] Cuando el antígeno contiene un único epítopo, los anticuerpos detectados son entonces específicos de dicho epítopo.

15

[0144] Cuando el antígeno contiene dos o más de dos epítopos diferentes, los anticuerpos detectados pueden ser específicos de uno, dos o más de dos epítopos de dicho antígeno.

[0145] Se describe un procedimiento de detección de anticuerpos específicos de un antígeno, en una muestra biológica, que consta de los siguientes pasos:

20

a) poner en contacto dicha muestra biológica con una proteína de fusión N-antígeno que contiene un antígeno fusionado en fase en C-terminal de una proteína N de un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*;

b) detectar los complejos de proteína de fusión N-antígeno/anticuerpo formados,

25

[0146] la presencia de dichos complejos revela la presencia de anticuerpos específicos del antígeno en la muestra biológica

[0147] La invención se refiere a un procedimiento de detección de anticuerpos específicos de un antígeno, en una muestra biológica, que consta de los siguientes pasos:

30

a) poner en contacto dicha muestra biológica con una proteína de fusión según la invención que contiene un antígeno fusionado en fase en C-terminal de una proteína N de un virus respiratorio sincicial;

b) detectar los complejos de proteína de fusión N-antígeno/anticuerpo formados, porque la presencia de dichos complejos revela la presencia de anticuerpos específicos del antígeno en la muestra biológica.

35

[0148] La muestra biológica puede ser una muestra de tejido obtenido por ejemplo por biopsia muscular, hepática, cardíaca, cerebral, etc o una muestra líquida, por ejemplo, un líquido biológico como la sangre, el plasma, o el líquido cefalorraquídeo.

40

[0149] La detección de los complejos puede realizarse por los medios habituales con los que el experto en la materia está muy familiarizado, como la cromatografía (de exclusión por tamaño, de afinidad, etc) o la electroforesis en condiciones no desnaturizadoras.

[0150] La detección de los complejos N-antígeno/anticuerpos puede facilitarse marcando las proteínas N de forma detectable.

45

[0151] Para cada uno de estos aspectos, la proteína N puede ser una proteína N nativa, o, haber sido modificada en la región definida por los 25, preferentemente los 20, 15, 10 o 5 últimos aminoácidos C-terminales, a condición de que la proteína N modificada conserve la capacidad de interactuar con la proteína P. Estas modificaciones consisten típicamente en una supresión, sustitución y/o inserción de uno o varios aminoácidos (por ejemplo de 1 a 25, o 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, o incluso 1 a 5 aminoácidos contiguos o no) en la secuencia C-terminal de la proteína N. Un ejemplo de modificación de secuencia de la proteína N puede consistir en una supresión de los 6 o 12 aminoácidos C-terminales, dichas proteínas truncadas (NΔ6C y NΔ12C) siguen siendo todavía capaces de interactuar con la proteína P.

50

55

[0152] Los ejemplos y figuras siguientes ilustran la invención de forma no limitativa.

FIGURAS

60

[0153]

La figura 1 muestra la captura de los complejos N-GFP-PΔN por células HEp2 o RAW. Las células HEp-2 (A; C) o

RAW (B; D) se incuban en presencia de DX-FITC (A; B) o N-GFP-PΔN (C; D). La incubación dura una hora a 4 °C (curvas dibujadas con línea de puntos) o dos horas a 4 °C (curvas dibujadas con línea continua gruesa), o una hora a 37 °C (curvas dibujadas con línea continua) o dos horas a 37 °C (curvas dibujadas con línea de puntos gruesa). La fluorescencia (FITC o GFP) se analiza en citometría de flujo sobre 100 000 eventos.

- 5 La figura 2 muestra que los complejos N-GFP-PΔN son interiorizados en las células RAW. Las células RAW se incuban durante una hora en presencia de N-GFP-PΔN a 4 °C (curvas dibujadas con línea continua gruesa) o a 37 °C (curvas dibujadas con línea de puntos). La proteína N es detectada por inmunomarcado indirecto en citometría de flujo en células no permeabilizadas (A) o células permeabilizadas (B). La autofluorescencia de las células viene dada por la señal de las células incubadas a 37 °C en PBS (curvas dibujadas con línea continua).
- 10 La figura 3 muestra el aumento de la respuesta anticuerpo por la vectorización de la GFP en los complejos N-PΔN. Se inmuniza a los ratones BALB/c el D0 por vía nasal, con el adyuvante solo (testigo), el complejo N-GFP-PΔN, N-PΔN o la GFP, siempre en presencia del adyuvante. Se aplica una dosis de recuerdo tras dos semanas (D14). Se realiza una eutanasia a los animales dos semanas después de la dosis de recuerdo (D28). Se recoge el suero el D0, D14 y D28 (A y B). Se realizan lavados broncoalveolares el D28 (C). La valoración de anticuerpos anti N-PΔN (B y C) y anti-GFP (A y C) se determina con ELISA. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (n=8 para los grupos testigo y GFP, n=6 para el grupo N-GFP-PΔ, n=4 para el grupo N-PΔ) y se representan según una escala logarítmica.
- La figura 4 ilustra la falta de respuesta T memoria ante la GFP, incluso en su forma vectorizada por N-PΔN. Se inmuniza a los ratones BALB/c el D0 por vía nasal, con el adyuvante solo (testigo), el complejo N-GFP-PΔN, N-PΔN o la GFP, siempre en presencia del adyuvante. Se aplica una dosis de recuerdo tras dos semanas (D14). Se realiza una autopsia a los animales dos semanas después de la dosis de recuerdo (D28) para extraer los bazo y los ganglios locorreogionales. Las suspensiones celulares se tratan individualmente en el caso de los bazo (rombos) y en conjunto por grupo en el caso de los ganglios (círculos). Las células vuelven a ser estimuladas durante 72 h con GFP (rombos y círculos blancos) o N-PΔN (rombos y círculos negros). La secreción de IFN- γ se mide con ELISA.
- 25 Cuando las células se cultivan en el medio solo, el nivel basal de IFN- γ es inferior a 15 pg/ml.

EJEMPLOS

- Ejemplo 1: Construcción de los plásmidos que contienen la región C-terminal de la fosfoproteína del RSV y la proteína N del RSV fusionada con la GFP.**

[0154] La proteína P del RSV cepa Long está compuesta por 241 residuos de aminoácidos.

- [0155] Se utilizan secuencias de cebadores oligonucleotídicos (de 5' hacia 3') para amplificar la parte C-terminal de la proteína P del RSV (están subrayadas las secuencias de restricción *Bam*HI; el codón iniciador («start») ATG del gen P está indicado en negrita):

LONG-*PBam*+: GAGGGATCCATCATGGAAAAGTTTGCTCCTG (SEQ ID NO: 13)

LONG-P-: CTGTTGGTGTGTGTGTTGAAGTGCAG (SEQ ID NO: 14)

P161B+: GAGGGATCCCTCTGCTAGGGATGGTATAAGAG (SEQ ID NO: 15)

- 40 P180B+: GAGGGATCCAAAATCAGAACTGAAGCATTAAATGACC (SEQ ID NO: 16)

P201 B+: GAGGGATCCGAGGAAAGTGAAGATGGCAAAG (SEQ ID NO: 17)

P221 B+: GAGGGATCCGAGAAATTGAACAACCTGTTGG (SEQ ID NO: 18)

P230NB+: GATCCAATGATAGTGACAATGATCATCACTTGAAGATTTCTGA (SEQ ID NO: 19)

P230N-: TCAGAAATCTTCAAGTGATAGATCATTGTCACTATCATTG (SEQ ID NO: 20)

45

[0156] El ADNc del gen P del RSV cepa Long se ha amplificado por RT-PCR a partir de células Hep-2 infectadas por la cepa Long del RSV humano, utilizando los cebadores LONG-*PBam*+ y LONG-P- (Castagné et al., 2004; Journal of General Virology; 85: 1643-1653). El producto de PCR ha sido digerido por la enzima de restricción *Bam*HI y clonado en el plásmido pGEX-4T-3 (Pharmacia) en las secuencias *Bam*HI-*Sma*I en fase con el gen codificador para la Glutación-S-Transferasa o GST. El plásmido se llama pGEX-P.

50

• Clonación de P161-241 (PA161N)

- [0157] La región C-terminal de P (aminoácidos 161-241) ha sido amplificada por PCR a partir del plásmido pGEX-P en las siguientes condiciones:

Cebadores de PCR: P161 B+ y LONG-P-100 ng cada (1 μ l cada)

ADN matriz pGEX-P: 10 ng (1 μ l)

Enzima: Pfu Turbo marca Stratagene (2,5 U por μ l): 1 μ l

- 60 dATP: 0.2 mM final

dGTP: 0.2 mM final

dCTP: 0.2 mM final

dTTP: 0.2 mM final
 Solución amortiguadora Pfu 1 X final (Stratagene)
 Volumen final: 100 µl

5 **[0158]** La PCR se ha realizado en las siguientes condiciones:

5 ciclos: 15 segundos a 94 °C, 2 minutos a 40 °C, 1 minuto a 72 °C;
 25 ciclos: 15 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C

10 **[0159]** El ADN amplificado se ha extraído con un volumen (100 µl) de fenol/cloroformo (1vol/1vol), y después con un volumen de cloroformo, y después se ha precipitado por adición de una décima de volumen de NaCl 5M (10 ml) y dos volúmenes de etanol al 100 % (200 ml). El ADN se ha centrifugado 20 minutos a 13000 g, lavado con un volumen de etanol al 70 %, secado, resuspendido en un volumen de agua de 90 ml. Después de añadir 10 ml de solución amortiguadora 10X para la enzima *Bam*HI, el ADN ha sido digerido 2 horas a 37 °C en presencia de 10 unidades de enzima *Bam*HI. El ADN digerido se ha depositado sobre un gel de agarosa al 1,5 % en una solución amortiguadora Tri-Borate-EDTA (TBE) 1X en presencia de bromuro de etidio y se ha dejado migrar por electroforesis. La banda que corresponde al ADN de P161-241 se ha cortado y el ADN se ha extraído por electroelución. De nuevo, se ha extraído con un volumen de fenol-cloroformo, un volumen de cloroformo y se ha precipitado con etanol. Se ha fijado con el vector pGEX-4T-3 digerido por *Bam*HI y *Sma*I después de la purificación con gel de agarosa al 1 %:

ADN pGEX4T-3: 100ng ADN P161-241: 100 ng
 Solución amortiguadora de ligasa 1X final
 Ligasa (5U/ml): 1 ml

25 Volumen final 20 ml

[0160] El conjunto se ha incubado una noche a 14 °C. Al día siguiente las bacterias DH5-alpha TM (Life Technologies) competentes se han transformado con 10 ml de producto de unión y se han colocado en una placa de Petri que contiene un medio LB-agar suplementado con 100 mg/ml de ampicilina final. Las colonias de bacterias recombinadas se han cribado con una minipreparación de plásmido y digestión por las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Los plásmidos recombinados muestran entonces dos bandas de gel de agarosa, una que corresponde al vector (4,9 kb) y la segunda que corresponde a la parte C-terminal de P (246 pb). Los plásmidos recombinados se han secuenciado completamente.

35 • Clonación de P180-241, P201-241, P221-241

[0161] Los fragmentos de P correspondientes a las partes de aminoácidos 180-241, 200-241, 220-241 se han obtenido por PCR a partir del plásmido pGEX-P utilizando los siguientes cebadores:

40 P180-241: cebadores P180B+ y LONG-P
 P200-241: cebadores P201 B+ y LONG-P
 P220-241: cebadores P221 B+ y LONG-P

Se han amplificado y clonado de la misma manera que P161-241 (ver más arriba).

45 • Clonación del gen codificante de la proteína de nucleocápside del RSV cepa Long.

[0162] El gen codificante de la proteína N del RSV humano cepa Long ha sido obtenido por RT-PCR a partir de células Hep-2 infectadas por ese virus. Los cebadores utilizados fueron:

50 LONG-N*Bam*+: GAGGGATCCATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTG (SEQ ID NO: 21)
 LONG-N-: TTA ACTCAAAGCTCTACATCATTATCTTTTGG (SEQ ID NO: 22)

[0163] Los productos de PCR han sido digeridos por *Bam*HI y clonados en el plásmido pGEX-4T-3 en las secuencias *Bam*HI-*Sma*I. La región codificante de N ha sido subclonada por digestión del plásmido pGEX-N por *Bam*HI-*Xho*I y subclonada en el plásmido pET28a+ (Novagen).

• **Mutagénesis del plásmido pET-N y creación de una secuencia de restricción única Sal antes del codón STOP**

60 **[0164]** Se ha introducido una secuencia de restricción *Sac*I justo antes del codón finalizador de la proteína N del RSV humano (cepa Long) por mutagénesis dirigida utilizando los oligonucleótidos:

Nfinsac+ CCAAAGATAATGATGTAGAGCTCTGACTCGAGCACCACCACC (SEQ ID NO: 23)
 Nfinsac- GGTGGTGGTCTCGAGTCAGAGCTCTACATCATTATCTTTTGG (SEQ ID NO: 24)

[0165] Esto ha permitido obtener el plásmido pET-N-Sac.

5

• **Obtención de la proteína N fusionada con la GFP**

[0166] La GFP se ha extraído del plásmido pEGFPN1 por digestión por la enzima de restricción *EagI*, y después por el tratamiento Klenow en presencia de nucleótidos para obtener hebras de misma longitud en el ADN, y después digerido por *SacI*. El plásmido pET-NSac ha sido digerido por la enzima *XhoI*, tratado por tratamiento Klenow en presencia de nucleótidos y después digerido por *SalI*. La GFP se ha insertado en el plásmido pET-N-Sac y ha permitido obtener el plásmido pET-N-Sac.

10

• **Obtención de la proteína N-epítos F**

15

[0167] Los epítos «mimótopo» y «heptad» de la proteína F del RSV han sido clonados en C-terminal de la proteína N por inserción de oligonucleótidos bicatenarios.

Epítoto Mimótopo:

20

[0168]

F-Flag-HWSISKPO+: CATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCACTGGTCTATCTCTAAACCGCAGTAG (SEQ ID NO: 25) F-Flag-HWSISKPQ-:

25

TCGACTACTGCGGTTTAGAGATAGACCAGTGCTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATGAGCT (SEQ ID: NO: 26)

[0169] Estos oligonucleótidos hibridados entre ellos y se han insertado en los las secuencias *SacI* *Sall* en el plásmido pET-N-GFP.

30

Epítoto Heptad.

[0170] Los siguientes oligonucleótidos se han hibridado entre ellos:

FheptadAge-: CCGGTCTCTACTAACAAGCTGTTGTTTCTCTGAGCTAGT (SEQ ID NO: 27) (STNKAVVLS) (SEQ ID NO: 28)

FheptadAge-: CCGGACTAGCTCAGAGAAACAACAGCTTTGTTAGTAGAGA (SEQ ID NO: 29)

40 Se han clonado en el sitio *AgeI* en el plásmido pET-N-GFP

• **Clonación de P231-241**

[0171] Los siguientes cebadores se han desnaturalizado por calentamiento a 94 °C, durante 5 minutos, y después se han enfriado a temperatura ambiente:

45

P231NB+: GATCCGATAGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTTCTGA (SEQ ID NO: 30)

P231 N-: TCAGAAATCTTCAAGTGATAGATCATTGTCACTATCG (SEQ ID NO: 31)

50 [0172] Después de la hibridación, se han unido 10 ng de oligonucleótidos de bicatenarios con 100 ng de ADN de plásmido pGEX4T-3 digerido por las enzimas *BamHI* y *SmaI* y purificado por electroforesis con gel de agarosa. Los plásmidos recombinados se han comprobado por secuenciación a nivel del gen N.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de los complejos

55

[0173] Se han transformado las bacterias BL21 (DE3) (Novagen) competentes con 1 mg de ADN pGEX-PΔ y 1 µg de ADN pET-N y después se han colocado en una placa de Petri con un medio LB-agar suplementado con 100 µg/ml final de ampicilina y 50 µg/ml final de kanamicina. Se ha cultivado una colonia y se ha dejado una noche a 37 °C en 2 ml de medio LB con ampicilina y kanamicina a 100 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente. Al día siguiente por la mañana, se ha utilizado 1 ml de cultivo saturado para sembrar 1 litro de medio LB con antibióticos y se ha dejado hasta la tarde. Por la tarde, se ha añadido al cultivo un volumen de medio fresco LB que contiene IPTG (que induce la expresión de las proteínas) a una concentración de 160 µg/ml y se ha dejado una noche a 28 °C. Al día siguiente

60

se centrifugan las bacterias durante 15 min a 5000 tpm y el residuo se retoma en 100 ml de la siguiente solución amortiguadora:

- 50 mM Tris pH 7,8
- 5 60 mM NaCl
- 2 mM DTT
- 1 mM EDTA
- 4 mM Benzamidina
- Antiproteasas 1X (Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, ref. Roche nº 11 873 580 001), es decir, una
- 10 tableta para 50 ml de solución amortiguadora de lisis
- 0,1 % Triton-X100

[0174] se añaden 10 ml de la misma solución amortiguadora al que se añade Lisozima a 10mg/ml (1mg/ml final). Las bacterias se incuban 1 hora en hielo (lisis). Cuando la mezcla se vuelve viscosa, se aplican los ultrasonidos 3 veces durante 1 minuto utilizando una sonda introducida en la mezcla, sobre el hielo, y dejándolo reposar 5 minutos entre cada aplicación. Se centrifuga la mezcla 30 minutos a 10 000 g a 4 °C y se coge el sobrenadante. Se centrifuga el sobrenadante 30 minutos a 10 000 g a 4 °C y se coge el nuevo sobrenadante. 4 ml de microesferas de sefarosa 4B-glutación (AmershamPharmacia) se lavan extrayendo 8 ml de mezcla de microesferas solución amortiguadora /vol/vol) con la solución amortiguadora de lisis. Se dejan en un volumen equivalente de solución amortiguadora, añadidas al lisado bacteriano clarificado, y se dejan rotando a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugan las microesferas a 2000 rpm durante 3 minutos, se elimina el sobrenadante, y se lavan las microesferas tres veces con la solución amortiguadora de lisis sin antiproteasas, tres veces en solución amortiguadora PBS 1X.

[0175] Se separan en capas las esferas en la secuencia de la trombina utilizando trombina biotilada (Novagen) a razón de 1 ml (1 U) de trombina («Thrombin Cleavage Capture Kit», Novagen N° 69022-3FRZ) para 1 ml de microesferas. Se incuban las microesferas durante la noche a 20 °C y, al día siguiente, se centrifugan 3 minutos a 2000 rpm, se dejan sedimentar 15 minutos para recoger el sobrenadante. Se añade un volumen equivalente de PBS 1X a las esferas; se agita la mezcla y se deja sedimentar. Se vuelve a recoger el sobrenadante y se añade al sobrenadante que se ha retirado anteriormente. Al sobrenadante que se ha recogido se le añaden esferas de agarosa Streptavidine (Novagen ref. 69203) a razón de 16 ml de resina (es decir 32 ml de mezcla de resina/amortiguador (vol/vol)). Se deja la mezcla en agitación durante una hora, y se centrifuga 3 minutos a 2000 rpm, y se recoge el sobrenadante. Se obtiene una concentración de proteínas de 2 mg/ml.

[0176] Se desnaturalizan 10 ml del sobrenadante que contiene los productos de separación en una solución amortiguadora de Laemmli 1X, se ponen a hervir y se depositan en un gel de poliacrilamida al 12 % en solución amortiguadora Tris-Glycine SDS 0,1 %, y se tiñen con color azul de Coomassie tras la electroforesis para visualizar las proteínas.

40 **Ejemplo 3: Separación de N-GFP y PΔ161N (P161-241) y purificación de los anillos de N-GFP**

[0177] Las proteínas presentes en el sobrenadante pueden separarse por cromatografía de exclusión por tamaño (gel filtration) en PBS 1X.

45 **Ejemplo 4: Captura de los complejos N-PΔN por diferentes estirpes celulares: estudio con ayuda de la proteína de fusión N-Green Fluorescent Protein (GFP).**

I. Material y métodos

I.1 Líneas celulares y pruebas de fagocitosis:

50 **[0178]**

HEp-2: estirpe epitelial humana de laringe (Cancer Res 1955;15:598), cultivada en monocapa en EMEM (*Eagle's* Minimum Essential Medium) + 10 % SVF+ L-glutamina+ PS (penicilina, estreptomocina).

55 RAW: estirpe de monocitos-macrófagos peritoneales murinos (J. Immunol 1977;119:950) cultivada en monocapa en DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) + 10 % SVF + L-glutamina + PS.

[0179] Las estirpes celulares se disocian en D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) + 0,33 % lidocaína + 5 mM EDTA. Se lavan las células aisladas, se añaden a una concentración de 107 células/ml en PBS/2 %SVF y se incuban en agitación suave en tubos de 5 ml de fondo redondo en presencia de:

- P161-241 + N-GFP (N-GFP-PΔN) a 20 µg/ml
- GFP a 6,5 µg/ml -
- Dextran-FITC (DX-FITC) a 1 mg/ml (Ref: D-1844, Molecular Probes).

5 **[0180]** Las incubaciones se hacen paralelamente a 4 °C, temperatura a la cual los mecanismos de endocitosis se inhiben y a 37 °C, temperatura permisiva para la interiorización. Después de una o dos horas de incubación, se lavan las células tres veces y se añaden a PBS + 2 %SVF.

I.2 Análisis de la adsorción/interiorización por citometría de flujo

10 **[0181]** Se compara, por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton), la fluorescencia (FL1) asociada a las células (HEp2, RAW) incubadas con moléculas fluorescentes (DX-FITC o N-GFP-PΔN) a 4 °C o 37 °C. El nivel de autofluorescencia de las células viene dado por las células incubadas dos horas a 37 °C en ausencia de moléculas fluorescentes.

I.3 Análisis de la adsorción/interiorización en microscopio de fluorescencia

15 **[0182]** Después de la incubación, se colocan 105 células por citocentrifugado en láminas superfrost plus (SFPLUS42, Milian). Se secan las láminas 15 minutos y se montan utilizando PERTEX (Ref: 00814, Histolab).

20 **[0183]** Se observa el nivel de fluorescencia en el microscopio (Axiovert200M, Zeiss). La toma de vistas se realiza con una cámara (Coolsnap HQ) y con el programa Metavue.

I.4 Inmunodetección de la proteína N tras la permeabilización de las células.

25 **[0184]** El objetivo es comparar, por inmunodetección de la proteína N, la señal que se detecta en las células no permeabilizadas (complejo N-GFP-PΔN extracelular), con la señal que se detecta en las células permeabilizadas (complejo N-GFP-PΔN intra y extracelular).

30 **[0185]** Se fijan las células durante 15 minutos en solución amortiguadora A (Ref: GAS-003, Caltag) y se lavan.

35 **[0186]** En el caso de las células no permeabilizadas, el marcado se hace en solución amortiguadora Cell Wash (Becton) +5 %SVF. Para permeabilizar las células durante el marcado, se utiliza la solución amortiguadora B (Ref: RGAS-003, Caltag). Se saturan los receptores Fc durante 20 minutos con un anticuerpo anti-CD16/CD32 (Ref: 553141, Becton) diluido al 1/100. Después, se incuban las células durante 30 minutos con un suero de conejo dirigido contra la proteína N, diluido al 1/1000. La detección de los Ig de conejos se hace con una incubación de 30 minutos con un anticuerpo biotinilado (Ref: BA-1000, Vector) diluido al 1/200. El uso de estreptavidina acoplada al APC (554067, Becton) al 1/500 permite la detección indirecta en el canal F14 de la proteína N en citometría de flujo

40 (FACSCalibur, Becton).

II. Resultados:

II-1 Análisis de la interacción de los complejos N-GFP-PΔN con las células RAW (macrófagos) y HEp2 (epiteliales):

45 **[0187]** Las células RAW son una estirpe de monocitos-macrófagos. Tienen una capacidad de fagocitosis que se puede observar poniendo en contacto con ellas un polímero fluorescente, el DX-FITC. La captura del DX-FITC aumenta fuertemente a 37 °C frente a 4 °C (fig. 1B). La estirpe HEp-2 es una estirpe epitelial. No tiene capacidad de fagocitosis, por lo que la fluorescencia vinculada con la interacción entre el DX-FITC y sus células no es muy

50 diferente entre las incubaciones a 4 °C y a 37 °C (fig. 1 A).

[0188] Cuando los complejos N-GFP-PΔN se ponen en contacto con las células RAW y HEp-2 se observa un fuerte aumento del nivel de fluorescencia respecto del nivel basal (PBS) (fig. 1, C, D). Esto indica una adsorción eficaz en la membrana de las células. Tras la incubación a 37 °C, la fluorescencia detectada en presencia de N-GFP-PΔN disminuye en los dos tipos celulares, pero sin embargo sigue siendo superior al nivel basal (fig. 1 C, D). Cuando las células se incuban con la GFP recombinante, la señal de fluorescencia se mantiene al nivel basal (datos no mostrados). Esto indica que los fenómenos de captura observados están relacionados con los anillos de N-PΔN y no con la GFP.

60 **[0189]** La captura de los anillos de N-GFP-PΔNh en las estirpes RAW y HEp-2 se ha confirmado con el microscopio.

[0190] La fluorescencia específica de la GFP fusionada con la proteína N se encuentra en forma de gránulos en el interior de las células HEp-2 o RAW. Esta fluorescencia no se encuentra en caso de que la incubación se haga con la GFP recombinante. Los complejos N-GFP-PΔN se absorben o se interiorizan en la estirpe macrofágica RAW y en la estirpe epitelial HEp-2.

5

II.2 Interiorización de los complejos N-GFP-PΔN por las células RAW

[0191] Para entender la evolución de los complejos N-GFP-PΔN en las células RAW a 37 °C frente a 4 °C, se permeabilizan las células y la presencia de la proteína N se revela por inmunomarcado y análisis de citometría de flujo (fig. 2). Si no se produce permeabilización, la cantidad de N detectada (señal de fluorescencia) es más débil a 37 °C que a 4 °C (fig. 2A). En cambio, tras la permeabilización, el nivel de la señal vuelve a ser idéntico entre las condiciones de incubación 37°C y 4°C (fig. 2B). Los complejos N-GFP-PΔN se interiorizan entonces durante la incubación a 37 °C.

[0192] En conclusión, el conjunto de experimentos realizados con los complejos N-GFP-PΔN, en citometría de flujo y con microscopio, ha permitido poner de relieve las propiedades originales de estas estructuras proteicas. Las combinaciones en anillos de la nucleoproteína tienen la capacidad de adsorber y de ser interiorizadas eficazmente por tipos celulares variados como los macrófagos, las células epiteliales y las células dendríticas (datos no mostrados). Estas propiedades son particularmente interesantes para el uso de esas estructuras como vector de antígeno en vacunación.

Ejemplo 5: Evaluación de las propiedades del vector antígeno de la proteína N en anillo respecto de la Green Fluorescent Protein (GFP) expresada en fusión

25 I. Material y métodos

I.1 Ratón:

[0193] BALB/c hembras de 8-10 semanas, criadas en la Unidad Experimental Animalario Roedor (Unité Expérimentale Animalerie Rongeur, INRA, Jouy-en-Josas).

30

I.2 Antígenos:

[0194]

35

- P161-241 + N-GFP (N-GFP-PΔN) concentración a 0,1064 µg/µl
- GFP concentración a 0,5 µg/µl -
- P161-241+N (N-PΔN) concentración a 1 µg/µl

I.3 Adyuvante:

[0195]

- LT(R192G) linfotóxina destoxificada de *E. coli*, 1 mg/ml (lote enviado por John Clements; Choi et al., 2004, Protein Expression and Purification 38, pp 205)

45

I.4 Inmunización:

[0196] Administración por vía intranasal (i.n) con anestesia avertina (300 hl i.p.) de la siguiente mezcla (60 µl / ratón):

50

- 5 µg de LT(R192G)
- 5 µg N-GFP-PΔN
 - o 1.7 µg de GFP soluble
 - o 3.3 µg N-PΔN
 (cantidades de GFP o de N-PΔN correspondientes a las presentes en 5 µg de N-GFP-PΔN)
- qsp 60 µl con suero fisiológico apirógeno

55

[0197] Todas las soluciones se pasan por un filtro 0,22 µm antes de la inyección.

60

Grupos	D0 Primera inyección	D14 recuerdo	D32 autopsia
testigo	LT(R192G) i.n. suero	LT(R192G) i.n. suero	Suero Bazo LBA gg drenantes
	GFP	GFP	Suero
GFP	+LT(R192G) i.n. suero	+ LT(R192G) i.n. suero	Bazo LBA gg drenantes
N-PΔN	N-PΔN +LT(R192G) i.n. suero	N-PΔN + LT(R192G) i.n. suero	Suero Bazo LBA gg drenantes
N-GFP-PΔN	N-GFP-PΔN +LT(R192G) i.n. suero	N-GFP-PΔN + LT(R192G) i.n. suero	Suero

LBA: lavado broncoalverolar (con 1 ml de PBS 1 mM EDTA) gg: ganglios

I.5 Producción de anticuerpos anti N-PΔN y anti GFP:

5 **[0198]** Los anticuerpos anti-N-PΔN o anti-GFP (IgH+L y IgA) se buscan en los sueros y los LBA por ELISA:

- Los sueros se recogen a partir de extracciones de sangre (1 noche de exudación a 4 °C) y a continuación se congelan a -20 °C.

10 - Los LBA se centrifugan 5 min a 1700 rpm, los sobrenadantes se recogen (1 ml aproximadamente) y se congelan a -20 °C.

[0199] Se sensibilizan placas de 96 pocillos (Immulon 2HB, ThermoLabsystems) durante una noche a 4 °C con el complejo N-PΔN o la proteína GFP recombinante (200 ng por pocillo, 100 μl por pocillo) en solución amortiguadora de bicarbonato 0,1 M pH 9,5. Se lavan las placas 5 veces con 200 μl por pocillo de PBS 0,05% tween 20 (utilizando un analizador automático Wellwash, Labsystems). A continuación, se saturan las placas durante 1 h a 37 °C con 150 μl por pocillo de solución amortiguadora PBS 0,05 % tween 20 y 5 % de suero fetal bovino (utilizando un analizador automático Wellwash, Labsystems). Después de 5 lavados, las muestras que se van a titular se diluyen en PBS-T-SVF (siete disoluciones sucesivas de razón 3 partiendo de una primera disolución al 30° para los sueros y al tercio para los LBA). Se incuban las placas durante 2h a 37 °C. Después de 5 lavados, el anticuerpo secundario diluido en PBS-T-SVF se distribuye a razón de 100 ml por pocillo. Se utilizan los anticuerpos secundarios conjuntamente con la peroxidasa y se dirigen contra las inmunoglobulinas de ratón: Ig(H+L) (4000°, P.A.R.I.S.) o IgA (1000°, Caltag). Se incuban las placas durante 2h a 37 °C y se lavan 5 veces. Seguidamente, se incuban las placas con el sustrato de la peroxidasa (TMB, 100 ml por pocillo) durante 10 min a oscuras. La reacción enzimática se para al añadir 50 ml de H3PO4 2M. Se leen las densidades ópticas (DO) a 450 nm (lector Dynex). La curva D0450=f(disolución) está modelizada por la curva de regresión $y=(b+cx)/(1+ax)$ con ayuda del programa Origin. El título del anticuerpo se determina como el valor de disolución que da dos veces la D0450 de una muestra testigo (DO) en su mayor disolución.

I.6 Producción de IFN-γ/IL-4 por linfocitos T específicos de N-PΔN o de GFP

30

[0200] El bazo y los ganglios que drenan el tracto respiratorio (faciales, cervicales y mediastínicos) se tratan siguiendo el mismo procedimiento. Los bazos se tratan individualmente y los ganglios se agrupan por lote experimental.

35 **[0201]** Los órganos linfáticos se cortan y se pasan delicadamente por un filtro (tamiz celular 100 μm, BD Falcon) en un medio RPMI y PS. La suspensión celular se centrifuga a 1700 rpm durante 10 min a 4 °C. Las células se vuelven a poner en suspensión en 1 ml de solución amortiguadora de lisis de los eritrocitos (solución salina hipotónica) y se incuban durante 5 min a temperatura ambiente. Se para la reacción de lisis añadiendo 10 ml de RPMI completo (PS, 2 mM L-glutamina y 10 % SVF). Los restos membranosos se decantan y las células se lavan tres veces por centrifugado (1700 rpm durante 10 min a 4 °C). Las suspensiones celulares se recuentan con ayuda de una célula de Malassez.

40

[0202] Las células se ponen en un cultivo en microplacas de 96 pocillos tratadas para el cultivo celular

(Falcon) a razón de 400 000 células por pocillo en 200 µl de medio RPMI completo. Se prueban cuatro condiciones de cultivo por triplicado en cada suspensión celular:

- PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma) 10 ng/ml y ionomicina (Sigma) 1 µg/ml (testigo positivo, activación polyclonal)
- RPMI completo (testigo negativo)
- N-PΔN 10 µg/ml
- GFP 10 µg/ml.

10 **[0203]** Después de 48 h (IL-5 e IL-10) o 72 h (IFN-γ) de cultivo a 37 °C con el 5 % de CO₂, se recogen los sobrenadantes del cultivo y se congelan a -20 °C hasta la titulación de las citocinas por ELISA:

Se sensibilizan placas de 96 pocillos (Immulon 2HB, ThermoLabsystems) una noche a 4 °C con el anticuerpo de captura anticitocina de ratón a 4 µg/ml (IFN-γ) o 2 µg/ml (IL-5/IL-10) en solución amortiguadora de bicarbonato 0,1 M pH 9,5 (100 µl/pocillo). Se lavan las placas 5 veces con 200 µl por pocillo de PBS 0,05% tween 20 (utilizando un analizador automático Wellwash, Labsystems). A continuación se saturan las placas durante 2 h a 37 °C con 150 µl por pocillo de solución amortiguadora PBS 0,05% tween 20 y un 2 % de albúmina de suero bovina (PBS-T-BSA). Tras 5 lavados, la referencia citocina de ratón recombinada y las muestras para titular se diluyen en PBS-T-BSA por diluciones sucesivas a la mitad. Se realizan cuatro diluciones sucesivas a la mitad en las muestras puras. Entonces se incuba la placa durante una noche a 4 °C. Después de 5 lavados, el anticuerpo de detección biotinilado se distribuye (1 µg/ml para IFN-γ/IL-10 o 0,5 µg/ml para IL-5 en PBS-T-BSA, 100 µl/pocillo) y se incuba 3 h a 4 °C. Después de 5 lavados, el conjugado estreptavidina-peroxidasa (Pierce) se distribuye (1 µg/ml en PBS-T-BSA, 100 µl/pocillo) y se incuba 1 h a 4 °C. Después de 5 lavados, el sustrato de la peroxidasa (ABTS+H₂O₂) se distribuye en los pocillos. Después de 5 minutos de incubación, se leen las densidades ópticas a 405 nm (lector ELISA Dynex). El cálculo de la concentración en IFN-γ/IL-5/IL-10 en las muestras se hace respecto de la gama de muestra utilizando el programa de análisis «Révélation» acoplado al lector.

[0204] Referencias de anticuerpos (BD Bioscience):

- 30 - IFN_γ: anticuerpos de captura: clon R4-6A2 (BD Bioscience, 551216)
- Anticuerpos de detección: clon XMG1.2 (BD Bioscience, ref 554410)
- mIFN-γ recombinante: R&D systems 485-MI - IL-5: anticuerpos de captura: clon TRFK5 (BD Bioscience, 554393)
- Anticuerpos de detección: clon TRFK4 (BD Bioscience, ref 554397)
- mL-5 recombinante: BD Bioscience 554581
- 35 - IL-10: anticuerpos de captura: clon JES5-2A5 (BD Bioscience, 551215)
- Anticuerpos de detección: clon SXC-1 (BD Bioscience, ref 554423)
- mL-10 recombinante: BD Bioscience 550070
- Estreptavidina peroxidasa Immunopure (Pierce 21126)

40 I.7 Análisis estadísticos:

[0205] Los grupos se comparan de dos en dos haciendo una prueba U de Mann-Whitney (<http://eatworms.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>). Un valor p<0,05 se considera significativo.

45 **II. Resultados:**

[0206] Para evaluar las potencialidades de los anillos formados por el complejo N-PΔN como vector vacunal, se han inmunizado ratones BALB/c contra la GFP (antígeno modelo) en forma de una proteína de fusión con la nucleoproteína N del RSV. La proteína de fusión N-GFP forma estructuras de anillos solubles que se pueden purificar según el procedimiento descrito anteriormente (patente FR0504426). Así se obtienen los complejos proteicos NGFP-PΔN. Para un uso vacunal, las proteínas N-GFP y P se pueden separar, pero esta operación no es necesaria, puesto que los resultados anteriores de los Inventores sobre la inmunogenicidad de los anillos de N han demostrado que la presencia de PΔN no tiene efecto negativo.

55 **[0207]** Habida cuenta de los trabajos orientados a los patógenos que atacan las vías respiratorias y de la inmunogenia demostrada de los complejos N-PΔN administrados por vía nasal, esta vía de administración se privilegia para demostrar las propiedades vectorales de estos complejos. Asimismo, se han inmunizado lotes de ratones contra la proteína GFP en su forma recombinante nativa y contra los complejos N-PΔN. La linfotóxina destofixada de *E. coli*, LT(R192G) cuyas proteínas adyuvantes por vía mucosa se han descrito suficientemente (McNeal et al. 2002, Freytag et Clements 2005) se utiliza como adyuvante para todos los grupos de animales de este ejemplo.

[0208] Los parámetros de la respuesta inmunitaria dirigida contra la GFP y contra N-PΔN que se han analizado son (i) la producción de anticuerpos séricos y mucosos (por lavados broncoalveolares) y (ii) la respuesta celular a través de la producción de citocinas (IFN-γ, IL-5 e IL-10) por linfocitos T de memoria aislados del bazo o de los ganglios que drenan el tracto respiratorio.

5

II-1 Los anillos de N son un vector eficaz que pueden dirigirse a los anticuerpos contra un antígeno exógeno, ejemplo de la GFP

[0209] Los complejos N-PΔN son altamente inmunógenos por vía sistémica y por vía mucosa (patente FR0504426). La fusión de la GFP con la proteína N no altera la intensidad de la respuesta Ac anti N-PΔN, ya sea a nivel sérico (fig. 3B) y mucoso (fig. 3C): no hay diferencia significativa entre los grupos N-GFP-PΔN y N-PΔN.

[0210] La GFP administrada por vía nasal induce una respuesta Ac sistémica (fig. 3A; GFP frente al testigo, $p=0,003$) pero no una respuesta local (fig. 3C; GFP frente al testigo, no significativo).

15

[0211] En cambio, la asociación de la GFP a los complejos N-PΔN aumenta fuertemente la tasa de anticuerpos anti-GFP respecto de la GFP sola. El nivel de los anticuerpos anti-GFP se multiplica por un factor 4 a nivel sérico (N-GFP-PΔN frente a GFP, $p=0,039$) y por un factor 100 a nivel de los LBA (N-GFP-PΔN frente a GFP, $p=0,014$).

20

II-2 La vectorización de la GFP sobre los anillos de N no aumenta la respuesta T específica:

[0212] Además de su gran capacidad para estimular la respuesta de los anticuerpos, los N-PΔN estimulan eficazmente la respuesta T de memoria mostrada por una síntesis de IFN-γ antígeno-dependiente a nivel sistémico (patente FR0504426 y Figura 4, bazos N-PΔN frente a testigo, $p=0,01$) pero también local (fig. 4 ganglios locorreregionales). La fusión de un antígeno exógeno como la GFP sobre la N no perturba el establecimiento de estas respuestas T, ya sea a nivel del bazo (N-GFP-PΔN frente a N-PΔN, sin diferencia) o a nivel de los ganglios (figura 4).

[0213] Sin embargo, sea cual sea el modo de presentación de la GFP (sola o fusionada con N), no se observa ninguna respuesta T específica de la GFP, medida por la producción de IFN-γ (Fig. 4) o de IL-5/IL-10 (no mostrada): no hay diferencia significativa entre los grupos testigo, N-GFP-PΔN y GFP.

[0214] En conclusión, el ejemplo de la GFP ha permitido mostrar que los complejos N-PΔN son vectores de antígeno muy poderosos para estimular respuestas de anticuerpos, en concreto a nivel mucoso. Sin embargo, han demostrado ser poco eficaces para estimular una respuesta T de memoria contra esos mismos antígenos. Es importante señalar que la fusión de un antígeno exógeno no ha alterado la inmunogenia propia de los complejos N-PΔN.

[0215] Estos resultados permiten plantearse la utilización de los complejos N-PΔN como vector de antígeno con el objetivo de estimular altas respuestas de los anticuerpos. En el marco de la vacunación contra el RSV, los resultados obtenidos muestran que se puede sacar provecho a la vez de la respuesta celular contra la nucleoproteína y una respuesta de anticuerpo contra los antígenos/epítomos del RSV conocidos por ser el objetivo de los anticuerpos neutralizantes. Estas dos facetas de las defensas inmunitarias son críticas para obtener una inmunidad esterilizadora contra el RSV.

45

[0216] De forma general, para muchos patógenos (en concreto los virus), los epítomos o antígenos objetivo de los anticuerpos neutralizantes están suficientemente descritos en la literatura y participan en el control eficaz de la infección. Por ello, en el ámbito de la vacunación hay una gran búsqueda de nuevos vectores para estimular eficazmente estas respuestas. Los complejos N-PΔN presentan además la ventaja de ser estructuras inertes que no se reproducen y por tanto sin riesgos para el anfitrión y el entorno.

50

Ejemplo 6: Optimización de la secuencia de unión entre la proteína N y la proteína GFP

[0217] La purificación de las proteínas de fusión N-GFP se realiza por afinidad con la proteína P (fragmento 161-241) fusionada con la GST. La proteína N-GFP construida de conformidad con el ejemplo 1 (SEQ ID NO: 33) se purifica con un rendimiento diez veces más débil que la proteína N. Además, se sigue observando la presencia de dos polipéptidos migrantes con una masa aparente de 43 kDa aproximadamente. Estas bandas se han analizado por espectrometría de masa (MALDI-TOF). Corresponden a una descomposición que se produce (i) en la secuencia de unión que separa N de GFP (a nivel de una arginina) y que resulta en la adición de 11 residuos en C-terminal de la proteína N, y (ii) en la parte C-terminal de la proteína N (a nivel de una lisina) retirando los 6 últimos residuos. La construcción de una proteína N eliminada de 6, 12 y 27 residuos en C-terminal ha mostrado que las proteínas NΔ6C y NΔ12C interactúan siempre con P, contrariamente a la forma trunca NΔ27C.

60

[0218] Por tanto, la secuencia de unión entre N y GFP se ha modificado, sustituyendo la secuencia KLRILQSTVPR↓ARDPPVAT (SEQ ID NO: 34, la flecha indica la secuencia de descomposición en el *E. coli*) por la secuencia KLRILQSTVPSERPQASGVYMGNLTTTRGPVAT (SEQ ID NO: 32).

5

[0219] Esto ha dado como resultado una proteína de fusión N-GFP (SEQ ID NO: 35) más estable que ya no se degrada en la bacteria (falta de bandas suplementarias de gel SDS-PAGE) y que se purifica con los mismos rendimientos que la proteína N nativa, sola.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0220]

<110> Institut National de la Recherche Agronomique

15

<120> Proteínas de fusión proteína N de un virus de la familia Paramyxoviridae - proteína de interés y sus usos para la vacunación y la vectorización intracelular

<130> BET07P0251

20

<150> FR0603410

<151> 2006-04-18

<160> 35

25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 391

30

<212> PRT

<213> Virus sincitial respiratorio humano

<400> 1

ES 2 612 741 T3

Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser
 20 25 30

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys
 35 40 45

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu
 50 55 60

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
 65 70 75 80

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp
 85 90 95

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu
 100 105 110

Val Leu Thr Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu
 115 120 125

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu
 130 135 140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile

ES 2 612 741 T3

```

145                150                155                160
Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
      165                170                175
Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn
      180                185                190
Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser
      195                200                205
Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys Tyr Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val
      210                215                220
His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
      225                230                235
Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
      245                250                255
Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
      260                265                270
Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
      275                280                285
Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
      290                295                300
Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
      305                310                315                320
Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
      325                330                335
Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
      340                345                350
Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
      355                360                365
Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
      370                375                380
Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
      385                390

```

<210> 2
 <211> 391
 5 <212> PRT

ES 2 612 741 T3

<213> Virus sincitial respiratorio bovino

<400> 2

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

ES 2 612 741 T3

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys Tyr Pro His Tyr Ile Asp Val Phe Val
 210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
 245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
 260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
 275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
 290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro Asn Phe
 305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
 325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
 340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
 355 360 365

Asp Leu Thr Thr Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys Asn Gln Leu Asn Pro
 370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
 385 390

<210> 3
 <211> 524
 5 <212> PRT
 <213> Virus Sendai

<400> 3

Met Ala Gly Leu Leu Ser Thr Phe Asp Thr Phe Ser Ser Arg Arg Ser
 1 5 10 15

Glu Ser Ile Asn Lys Ser Gly Gly Gly Ala Val Ile Pro Gly Gln Arg
 20 25 30

10

ES 2 612 741 T3

Ser Thr Val Ser Val Phe Val Leu Gly Pro Ser Val Thr Asp Asp Ala
 35 40 45

Asp Lys Leu Phe Ile Ala Thr Thr Phe Leu Ala His Ser Leu Asp Thr
 50 55 60

Asp Lys Gln His Ser Gln Arg Gly Gly Phe Leu Val Ser Leu Leu Ala
 65 70 75 80

Met Ala Tyr Ser Ser Pro Glu Leu Tyr Leu Thr Thr Asn Gly Val Asn
 85 90 95

Ala Asp Val Lys Tyr Val Ile Tyr Asn Ile Glu Lys Asp Pro Lys Arg
 100 105 110

Thr Lys Thr Asp Gly Phe Ile Val Lys Thr Arg Asp Met Glu Tyr Glu
 115 120 125

Arg Thr Thr Glu Trp Leu Phe Gly Pro Met Val Asn Lys Ser Pro Leu
 130 135 140

Phe Gln Gly Gln Arg Asp Ala Ala Asp Pro Asp Thr Leu Leu Gln Ile
 145 150 155 160

Tyr Gly Tyr Pro Ala Cys Leu Gly Ala Ile Ile Val Gln Val Trp Ile
 165 170 175

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

Phe Asn Arg Leu Glu Ala Phe Arg Gln Asp Gly Thr Val Lys Gly Ala
 195 200 205

Leu Val Phe Thr Gly Glu Thr Val Glu Gly Ile Gly Ser Val Met Arg
 210 215 220

Ser Gln Gln Ser Leu Val Ser Leu Met Val Glu Thr Leu Val Thr Met
 225 230 235 240

Asn Thr Ala Arg Ser Asp Leu Thr Thr Leu Glu Lys Asn Ile Gln Ile
 245 250 255

Val Gly Asn Tyr Ile Arg Asp Ala Gly Leu Ala Ser Phe Met Asn Thr
 260 265 270

ES 2 612 741 T3

Ile Lys Tyr Gly Val Glu Thr Lys Met Ala Ala Leu Thr Leu Ser Asn
 275 280 285

Leu Arg Pro Asp Ile Asn Lys Leu Arg Ser Leu Ile Asp Thr Tyr Leu
 290 295 300

Ser Lys Gly Pro Arg Ala Pro Phe Ile Cys Ile Leu Lys Asp Pro Val
 305 310 315 320

His Gly Glu Phe Ala Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Leu Trp Ser Tyr Ala
 325 330 335

Met Gly Val Ala Val Val Gln Asn Lys Ala Met Gln Gln Tyr Val Thr
 340 345 350

Gly Arg Thr Tyr Leu Asp Met Glu Met Phe Leu Leu Gly Gln Ala Val
 355 360 365

Ala Lys Asp Ala Glu Ser Lys Ile Ser Ser Ala Leu Glu Asp Glu Leu
 370 375 380

Gly Val Thr Asp Thr Ala Lys Glu Arg Leu Arg His His Leu Ala Asn
 385 390 395 400

Leu Ser Gly Gly Asp Gly Ala Tyr His Lys Pro Thr Gly Gly Gly Ala
 405 410 415

Ile Glu Val Ala Leu Asp Asn Ala Asp Ile Asp Leu Glu Pro Glu Ala
 420 425 430

His Thr Asp Gln Asp Ala Arg Gly Trp Gly Gly Asp Ser Gly Asp Arg
 435 440 445

Trp Ala Arg Ser Thr Ser Ser Gly His Phe Ile Thr Leu His Gly Ala
 450 455 460

Glu Arg Leu Glu Glu Glu Thr Asn Asp Glu Asp Val Ser Asp Ile Glu
 465 470 475 480

Arg Arg Ile Ala Arg Arg Leu Ala Glu Arg Arg Gln Glu Asp Ala Thr
 485 490 495

Thr His Glu Asp Glu Gly Arg Asn Asn Gly Val Asp His Asp Glu Glu
 500 505 510

Asp Asp Ala Ala Ala Ala Ala Gly Met Gly Gly Ile
 515 520

<210> 4
 5 <211> 525

ES 2 612 741 T3

<212> PRT
 <213> Virus del sarampión

<400> 4

5

```

Met Ala Thr Leu Leu Arg Ser Leu Ala Leu Phe Lys Arg Asn Lys Asp
1           5           10           15

Lys Pro Pro Ile Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ile Arg Gly Ile Lys
           20           25           30

His Ile Ile Ile Val Pro Ile Pro Gly Asp Ser Ser Ile Thr Thr Arg
           35           40           45

Ser Arg Leu Leu Asp Arg Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Pro Asp Val
           50           55           60

Ser Gly Pro Lys Leu Thr Gly Ala Leu Ile Gly Ile Leu Ser Leu Phe
65           70           75           80

Val Glu Ser Pro Gly Gln Leu Ile Gln Arg Ile Thr Asp Asp Pro Asp
           85           90           95

Val Ser Ile Arg Leu Leu Glu Val Val Gln Ser Asp Gln Ser Gln Ser
           100          105          110

Gly Leu Thr Phe Ala Ser Arg Gly Thr Asn Met Glu Asp Glu Ala Asp
           115          120          125

Gln Tyr Phe Ser His Asp Asp Pro Ile Ser Ser Asp Gln Ser Arg Phe
130          135          140

Gly Trp Phe Glu Asn Lys Glu Ile Ser Asp Ile Glu Val Gln Asp Pro
145          150          155          160

Glu Gly Phe Asn Met Ile Leu Gly Thr Ile Leu Ala Gln Ile Trp Val
           165          170          175

Leu Leu Ala Lys Ala Val Thr Ala Pro Asp Thr Ala Ala Asp Ser Glu
           180          185          190

Leu Arg Arg Trp Ile Lys Tyr Thr Gln Gln Arg Arg Val Val Gly Glu
           195          200          205
  
```


ES 2 612 741 T3

Phe Arg Leu Glu Arg Lys Trp Leu Asp Val Val Arg Asn Arg Ile Ala
 210 215 220

Glu Asp Leu Ser Leu Arg Arg Phe Met Val Ala Leu Ile Leu Asp Ile
 225 230 235 240

Lys Arg Thr Pro Gly Asn Lys Pro Arg Ile Ala Glu Met Ile Cys Asp
 245 250 255

Ile Asp Thr Tyr Ile Val Glu Ala Gly Leu Ala Ser Phe Ile Leu Thr
 260 265 270

Ile Lys Phe Gly Ile Glu Thr Met Tyr Pro Ala Leu Gly Leu His Glu
 275 280 285

Phe Ala Gly Glu Leu Ser Thr Leu Glu Ser Leu Met Asn Leu Tyr Gln
 290 295 300

Gln Met Gly Glu Thr Ala Pro Tyr Met Val Ile Leu Glu Asn Ser Ile
 305 310 315 320

Gln Asn Lys Phe Ser Ala Gly Ser Tyr Pro Leu Leu Trp Ser Tyr Ala
 325 330 335

Met Gly Val Gly Val Glu Leu Glu Asn Ser Met Gly Gly Leu Asn Phe
 340 345 350

Gly Arg Ser Tyr Phe Asp Pro Ala Tyr Phe Arg Leu Gly Gln Glu Met
 355 360 365

Val Arg Arg Ser Ala Gly Lys Val Ser Ser Thr Leu Ala Ser Glu Leu
 370 375 380

Gly Ile Thr Ala Glu Asp Ala Arg Leu Val Ser Glu Ile Ala Met His
 385 390 395 400

Thr Thr Glu Asp Lys Ile Ser Arg Ala Val Gly Pro Arg Gln Ala Gln
 405 410 415

Val Ser Phe Leu His Gly Asp Gln Ser Glu Asn Glu Leu Pro Arg Leu
 420 425 430

Gly Gly Lys Glu Asp Arg Arg Val Lys Gln Ser Arg Gly Glu Ala Arg
 435 440 445

ES 2 612 741 T3

Glu Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Pro Ser Arg Ala Ser Asp Ala Arg Ala
 450 455 460

Ala His Leu Pro Thr Gly Thr Pro Leu Asp Ile Asp Thr Ala Ser Glu
 465 470 475 480

Ser Ser Gln Asp Pro Gln Asp Ser Arg Arg Ser Ala Asp Ala Leu Leu
 485 490 495

Arg Leu Gln Ala Met Ala Gly Ile Ser Glu Glu Gln Gly Ser Asp Thr
 500 505 510

Asp Thr Pro Ile Val Tyr Asn Asp Arg Asn Leu Leu Asp
 515 520 525

<210> 5

<211> 553

5 <212> PRT

<213> Virus de las paperas

<400> 5

Met Ser Ser Val Leu Lys Ala Phe Glu Arg Phe Thr Ile Glu Gln Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Asp Arg Gly Glu Glu Gly Ser Ile Pro Pro Glu Thr Leu Lys
 20 25 30

Ser Ala Val Lys Val Phe Val Ile Asn Thr Pro Asn Pro Thr Thr Arg
 35 40 45

Tyr Gln Met Leu Asn Phe Cys Leu Arg Ile Ile Cys Ser Gln Asn Arg
 50 55 60

Arg Ala Ser His Arg Val Gly Ala Leu Ile Ala Leu Phe Ser Leu Pro
 65 70 75 80

Ser Ala Gly Met Gln Asn His Ile Arg Leu Ala Asp Arg Ser Pro Glu
 85 90 95

Ala Gln Ile Glu Arg Cys Glu Ile Asp Gly Phe Glu Pro Gly Thr Tyr
 100 105 110

Arg Leu Ile Pro Asn Ala Arg Ala Asn Leu Thr Ala Asn Glu Ile Ala
 115 120 125

Ala Tyr Ala Leu Leu Ala Asp Asp Leu Pro Pro Thr Ile Asn Asn Gly

ES 2 612 741 T3

130 135 140

Thr Pro Tyr Val His Ala Asp Val Glu Leu Gln Pro Cys Asp Glu Ile
 145 150 155 160

Glu Gln Phe Leu Asp Arg Cys Tyr Ser Val Leu Ile Gln Ala Trp Val
 165 170 175

Met Val Cys Lys Cys Met Thr Ala Tyr Asp Gln Pro Ala Gly Ser Ala
 180 185 190

Asp Arg Arg Phe Ala Lys Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Glu Ala Arg
 195 200 205

Tyr Met Leu Gln Pro Glu Ala Gln Arg Leu Ile Gln Thr Ala Ile Arg
 210 215 220

Lys Ser Leu Val Val Arg Gln Tyr Leu Thr Phe Glu Leu Gln Leu Ala
 225 230 235 240

Arg Arg Gln Gly Leu Leu Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Met Val Gly Asp
 245 250 255

Ile Gly Lys Tyr Ile Glu Asn Ser Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Thr
 260 265 270

Leu Lys Tyr Ala Leu Gly Thr Lys Trp Ser Pro Leu Ser Leu Ala Ala
 275 280 285

Phe Thr Gly Glu Leu Thr Lys Leu Arg Ser Leu Met Met Leu Tyr Arg
 290 295 300

Asp Ile Gly Glu Gln Ala Arg Tyr Leu Ala Leu Leu Glu Ala Pro Gln
 305 310 315 320

Ile Met Asp Phe Ala Pro Gly Gly Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Tyr Ala
 325 330 335

Met Gly Val Gly Ser Val Leu Asp Val Gln Met Arg Asn Tyr Thr Tyr
 340 345 350

Ala Arg Pro Phe Leu Asn Gly Tyr Tyr Phe Gln Ile Gly Val Glu Thr
 355 360 365

Ala Arg Arg Gln Gln Gly Thr Val Asp Asn Arg Val Ala Asp Asp Leu
 370 375 380

ES 2 612 741 T3

Gly Leu Thr Pro Glu Gln Arg Asn Glu Val Thr Gln Leu Val Asp Arg
 385 390 395 400

Leu Ala Arg Gly Arg Gly Ala Gly Ile Pro Gly Gly Pro Val Asn Pro
 405 410 415

Phe Val Pro Pro Val Gln Gln Gln Gln Pro Ala Ala Val Tyr Ala Asp
 420 425 430

Ile Pro Ala Leu Glu Glu Ser Asp Asp Asp Gly Asp Glu Asp Gly Gly
 435 440 445

Ala Gly Phe Gln Asn Gly Val Gln Val Pro Ala Val Arg Gln Gly Gly
 450 455 460

Gln Thr Asp Phe Arg Ala Gln Pro Leu Gln Asp Pro Ile Gln Ala Gln
 465 470 475 480

Leu Phe Met Pro Leu Tyr Pro Gln Val Ser Asn Ile Pro Asn Asn Arg
 485 490 495

Ile Ile Arg Ser Ile Ala Ser Gly Gly Trp Lys Thr Lys Ile Tyr Tyr
 500 505 510

Asp Thr Thr Arg Met Val Ile Leu Asn Lys Met Gln Gly Ala Asn Thr
 515 520 525

Glu Thr Leu Ser Gln Thr Ile Pro Ile Lys Thr His Ser Cys Lys Trp
 530 535 540

Ala Thr Gly Met Ser Lys Ser Leu Thr
 545 550

<210> 6
 <211> 394
 5 <212> PRT
 <213> Metapneumovirus humano

<400> 6

Met Ser Leu Gln Gly Ile His Leu Ser Asp Leu Ser Tyr Lys His Ala
 1 5 10 15

Ile Leu Lys Glu Ser Gln Tyr Thr Ile Lys Arg Asp Val Gly Thr Thr
 20 25 30

ES 2 612 741 T3

Thr Ala Val Thr Pro Ser Ser Leu Gln Gln Glu Ile Thr Leu Leu Cys
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Tyr Ala Lys His Ala Asp Tyr Lys Tyr Ala Ala Glu
 50 55 60

Ile Gly Ile Gln Tyr Ile Ser Thr Ala Leu Gly Ser Glu Arg Val Gln
 65 70 75 80

Gln Ile Leu Arg Asn Ser Gly Ser Glu Val Gln Val Val Leu Thr Arg
 85 90 95

Thr Tyr Ser Leu Gly Lys Ile Lys Asn Asn Lys Gly Glu Asp Leu Gln
 100 105 110

Met Leu Asp Ile His Gly Val Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Ile Asp
 115 120 125

Lys Glu Ala Arg Lys Thr Met Ala Thr Leu Leu Lys Glu Ser Ser Gly
 130 135 140

Asn Ile Pro Gln Asn Gln Arg Pro Ser Ala Pro Asp Thr Pro Ile Ile
 145 150 155 160

Leu Leu Cys Val Gly Ala Leu Ile Phe Thr Lys Leu Ala Ser Thr Ile
 165 170 175

Glu Val Gly Leu Glu Thr Thr Val Arg Arg Ala Asn Arg Val Leu Ser
 180 185 190

Asp Ala Leu Lys Arg Tyr Pro Arg Met Asp Ile Pro Lys Ile Ala Arg
 195 200 205

Ser Phe Tyr Asp Leu Phe Glu Gln Lys Val Tyr His Arg Ser Leu Phe
 210 215 220

Ile Glu Tyr Gly Lys Ala Leu Gly Ser Ser Ser Thr Gly Ser Lys Ala
 225 230 235 240

Glu Ser Leu Phe Val Asn Ile Phe Met Gln Ala Tyr Gly Ala Gly Gln
 245 250 255

Thr Met Leu Arg Trp Gly Val Ile Ala Arg Ser Ser Asn Asn Ile Met
 260 265 270

Leu Gly His Val Ser Val Gln Ala Glu Leu Lys Gln Val Thr Glu Val

ES 2 612 741 T3

Pro Phe Ser Lys Leu Tyr Lys Glu Thr Ile Glu Thr Phe Asp Asn Asn
 100 105 110

Glu Glu Glu Ser Ser Tyr Ser Tyr Glu Glu Ile Asn Asp Gln Thr Asn
 115 120 125

Asp Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asp Arg Ile Asp Glu Lys Leu Ser Glu
 130 135 140

Ile Leu Gly Met Leu His Thr Leu Val Val Ala Ser Ala Gly Pro Thr
 145 150 155 160

Ser Ala Arg Asp Gly Ile Arg Asp Ala Met Val Gly Leu Arg Glu Glu
 165 170 175

Met Ile Glu Lys Ile Arg Thr Glu Ala Leu Met Thr Asn Asp Arg Leu
 180 185 190

Glu Ala Met Ala Arg Leu Arg Asn Glu Glu Ser Glu Lys Met Ala Lys
 195 200 205

Asp Thr Ser Asp Glu Val Ser Leu Asn Pro Thr Ser Glu Lys Leu Asn
 210 215 220

Asn Leu Leu Glu Gly Asn Asp Ser Asp Asn Asp Leu Ser Leu Glu Asp
 225 230 235 240

Phe

- <210> 8
- <211> 241
- 5 <212> PRT
- <213> Virus sincitial respiratorio bovino
- <400> 8

Met Glu Lys Phe Ala Pro Glu Phe His Gly Glu Asp Ala Asn Thr Lys
 1 5 10 15

Ala Thr Lys Phe Leu Glu Ser Leu Lys Gly Lys Phe Thr Ser Ser Lys
 20 25 30

Asp Ser Arg Lys Lys Asp Ser Ile Ile Ser Val Asn Ser Ile Asp Ile
 35 40 45

Glu Leu Pro Lys Glu Ser Pro Ile Thr Ser Thr Asn His Asn Ile Asn

ES 2 612 741 T3

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

ES 2 612 741 T3

Ser Thr Gly Ser Pro Pro Gly Lys Pro Pro Ser Thr Gln Asp Glu His
 260 265 270

Ile Asn Ser Gly Asp Thr Pro Ala Val Arg Val Lys Asp Arg Lys Pro
 275 280 285

Pro Ile Gly Thr Arg Ser Val Ser Asp Cys Pro Ala Asn Gly Arg Pro
 290 295 300

Ile His Pro Gly Leu Glu Ser Asp Ser Thr Lys Lys Gly Ile Gly Glu
 305 310 315 320

Asn Thr Ser Ser Met Lys Glu Met Ala Thr Leu Leu Thr Ser Leu Gly
 325 330 335

Val Ile Gln Ser Ala Gln Glu Phe Glu Ser Ser Arg Asp Ala Ser Tyr
 340 345 350

Val Phe Ala Arg Arg Ala Leu Lys Ser Ala Asn Tyr Ala Glu Met Thr
 355 360 365

Phe Asn Val Cys Gly Leu Ile Leu Ser Ala Glu Lys Ser Ser Ala Arg
 370 375 380

Lys Val Asp Glu Asn Lys Gln Leu Leu Lys Gln Ile Gln Glu Ser Val
 385 390 400

Glu Ser Phe Arg Asp Ile Tyr Lys Arg Phe Ser Glu Tyr Gln Lys Glu
 405 410 415

Gln Asn Ser Leu Leu Met Ser Asn Leu Ser Thr Leu His Ile Ile Thr
 420 425 430

Asp Arg Gly Gly Lys Thr Asp Asn Thr Asp Ser Leu Thr Arg Ser Pro
 435 440 445

Ser Val Phe Ala Lys Ser Lys Glu Asn Lys Thr Lys Ala Thr Arg Phe
 450 455 460

Asp Pro Ser Met Glu Thr Leu Glu Asp Met Lys Tyr Lys Pro Asp Leu
 465 470 475 480

Ile Arg Glu Asp Glu Phe Arg Asp Glu Ile Arg Asn Pro Val Tyr Gln
 485 490 495

Glu Arg Asp Thr Glu Pro Arg Ala Ser Asn Ala Ser Arg Leu Leu Pro

ES 2 612 741 T3

500 505 510

Ser Lys Glu Lys Pro Thr Met His Ser Leu Arg Leu Val Ile Glu Ser
 515 520 525

Ser Pro Leu Ser Arg Ala Glu Lys Ala Ala Tyr Val Lys Ser Leu Ser
 530 535 540

Lys Cys Lys Thr Asp Gln Glu Val Lys Ala Val Met Glu Leu Val Glu
 545 550 555 560

Glu Asp Ile Glu Ser Leu Thr Asn
 565

<210> 10

5 <211> 507

<212> PRT

<213> Virus del sarampión

<400> 10

10

Met Ala Glu Glu Gln Ala Arg His Val Lys Asn Gly Leu Glu Cys Ile
 1 5 10 15

Arg Ala Leu Lys Ala Glu Pro Ile Gly Ser Leu Ala Val Glu Glu Ala
 20 25 30

Met Ala Ala Trp Ser Glu Ile Ser Asp Asn Pro Gly Gln Asp Arg Ala
 35 40 45

Thr Cys Lys Glu Glu Glu Ala Gly Ser Ser Gly Leu Ser Lys Pro Cys
 50 55 60

Leu Ser Ala Ile Gly Ser Thr Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ile Arg Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Ser Gly Glu Ser Asp Asp Asp Ala Glu Thr Leu Gly Ile Pro
 85 90 95

Ser Arg Asn Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr His Val
 100 105 110

Tyr Asp His Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser
 115 120 125

Ile Met Val Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr Leu Ser Gly Gly
 130 135 140

ES 2 612 741 T3

Asp Asp Glu Ser Glu Asn Ser Asp Val Asp Ile Gly Glu Pro Asp Thr
 145 150 155 160
 Glu Gly Tyr Ala Ile Thr Asp Arg Gly Ser Ala Pro Ile Ser Met Gly
 165 170 175
 Phe Arg Ala Ser Asp Val Glu Thr Ala Glu Gly Gly Glu Ile His Glu
 180 185 190
 Leu Leu Lys Leu Gln Ser Arg Gly Asn Asn Phe Pro Lys Leu Gly Lys
 195 200 205
 Thr Leu Asn Val Pro Pro Pro Pro Asn Pro Ser Arg Ala Ser Thr Ser
 210 215 220
 Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly Thr Asp Ala Arg Leu Ala Ser Phe Gly
 225 230 235 240
 Thr Glu Ile Ala Ser Leu Leu Thr Gly Gly Ala Thr Gln Cys Ala Arg
 245 250 255
 Lys Ser Pro Ser Glu Pro Ser Gly Pro Gly Ala Pro Ala Gly Asn Val
 260 265 270
 Pro Glu Cys Val Ser Asn Ala Ala Leu Ile Gln Glu Trp Thr Pro Glu
 275 280 285
 Ser Gly Thr Thr Ile Ser Pro Arg Ser Gln Asn Asn Glu Glu Gly Gly
 290 295 300
 Asp Tyr Tyr Asp Asp Glu Leu Phe Ser Asp Val Gln Asp Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 Ala Leu Ala Lys Ile His Glu Asp Asn Gln Lys Ile Ile Ser Lys Leu
 325 330 335
 Glu Ser Leu Leu Leu Leu Lys Gly Glu Val Glu Ser Ile Lys Lys Gln
 340 345 350
 Ile Asn Arg Gln Asn Ile Ser Ile Ser Thr Leu Glu Gly His Leu Ser
 355 360 365
 Ser Ile Met Ile Ala Ile Pro Gly Leu Gly Lys Asp Pro Asn Asp Pro
 370 375 380

ES 2 612 741 T3

Thr Ala Asp Val Glu Leu Asn Pro Asp Leu Lys Pro Ile Ile Gly Arg
 385 390 395 400

Asp Ser Gly Arg Ala Leu Ala Glu Val Leu Lys Lys Pro Val Ala Ser
 405 410 415

Arg Gln Leu Gln Gly Met Thr Asn Gly Arg Thr Ser Ser Arg Gly Gln
 420 425 430

Leu Leu Lys Glu Phe Gln Leu Lys Pro Ile Gly Lys Lys Val Ser Ser
 435 440 445

Ala Val Gly Phe Val Pro Asp Thr Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Ile
 450 455 460

Arg Ser Ile Ile Lys Ser Ser Arg Leu Glu Glu Asp Arg Lys Arg Tyr
 465 470 475 480

Leu Met Thr Leu Leu Asp Asp Ile Lys Gly Ala Asn Asp Leu Ala Lys
 485 490 495

Phe His Gln Met Leu Met Lys Ile Ile Met Lys
 500 505

- <210> 11
- <211> 390
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de las paperas

- <400> 11

Met Asp Gln Phe Ile Lys Gln Asp Glu Thr Gly Asp Leu Ile Glu Thr
 1 5 10 15

Gly Met Asn Val Ala Asn His Phe Leu Ser Ala Pro Ile Gln Gly Thr
 20 25 30

Asn Ser Leu Ser Lys Ala Ser Ile Ile Pro Gly Val Ala Pro Val Leu
 35 40 45

Ile Gly Asn Pro Glu Gln Lys Asn Ile Gln His Pro Thr Ala Ser His
 50 55 60

Gln Gly Ser Lys Ser Lys Gly Ser Gly Ser Gly Val Arg Ser Ile Ile
 65 70 75 80

Val Pro Pro Ser Glu Ala Ser Asn Gly Gly Thr Gln Ile Pro Glu Pro
 85 90 95

ES 2 612 741 T3

Leu Phe Ala Gln Thr Gly Gln Gly Gly Ile Val Thr Thr Val Tyr Gln
 100 105 110
 Asp Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gly Ser Tyr Arg Ser Val Glu Leu Ala
 115 120 125
 Lys Ile Gly Lys Glu Arg Met Ile Asn Arg Phe Val Glu Lys Pro Arg
 130 135 140
 Thr Ser Thr Pro Val Thr Glu Phe Lys Arg Gly Ala Gly Ser Arg Ala
 145 150 155 160
 Gln Gly Gln Thr Ile Gln Glu Glu Gly Ile Asp Gly Asn Gly Ala Ser
 165 170 175
 Ala Gly Ser Lys Glu Arg Ser Gly Ser Leu Ser Gly Ala Thr Leu Tyr
 180 185 190
 Ala His Leu Ser Leu Pro Gln Gln Asp Ser Thr Pro Ala Asn Val Gly
 195 200 205
 Ile Ala Pro Gln Ser Ala Ile Ser Ala Asn Glu Ile Met Asp Leu Leu
 210 215 220
 Arg Gly Met Asp Ala Arg Leu Gln His Leu Glu Gln Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Val Leu Ala Gln Gly Ser Met Val Thr Gln Ile Lys Asn Glu Leu Ser
 245 250 255
 Thr Val Lys Thr Thr Leu Ala Thr Ile Glu Gly Met Met Ala Thr Val
 260 265 270
 Lys Ile Met Asp Pro Gly Asn Pro Thr Gly Val Pro Val Asp Glu Leu
 275 280 285
 Arg Arg Ser Phe Ser Asp His Val Thr Ile Val Ser Gly Pro Gly Asp
 290 295 300
 Val Pro Phe Ser Ser Ser Glu Glu Pro Thr Leu Tyr Leu Asp Glu Leu
 305 310 315 320
 Ala Arg Pro Val Ser Lys Pro Arg Pro Ala Lys Gln Thr Lys Pro Gln
 325 330 335

ES 2 612 741 T3

Pro Val Lys Asp Leu Ala Gly Arg Lys Val Met Ile Thr Lys Met Ile
 340 345 350

Thr Asp Cys Val Ala Asn Pro Gln Met Lys Gln Ala Phe Glu Gln Arg
 355 360 365

Leu Ala Lys Ala Ser Thr Glu Asp Ala Leu Asn Asp Ile Lys Lys Asp
 370 375 380

Ile Ile Arg Ser Ala Ile
 385 390

<210> 12
 <211> 294
 5 <212> PRT
 <213> Metapneumovirus humano

<400> 12

Met Ser Phe Pro Glu Gly Lys Asp Ile Leu Phe Met Gly Asn Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Ala Glu Ala Phe Gln Lys Ser Leu Arg Lys Pro Gly His
 20 25 30

Lys Arg Ser Gln Ser Ile Ile Gly Glu Lys Val Asn Thr Val Ser Glu
 35 40 45

Thr Leu Glu Leu Pro Thr Ile Ser Arg Pro Ala Lys Pro Thr Ile Pro
 50 55 60

Ser Glu Pro Lys Leu Ala Trp Thr Asp Lys Gly Gly Ala Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Gln Ala Ile Lys Val Met Asp Pro Ile Glu Glu Glu Glu
 85 90 95

Ser Thr Glu Lys Lys Val Leu Pro Ser Ser Asp Gly Lys Thr Pro Ala
 100 105 110

Glu Lys Lys Leu Lys Pro Ser Thr Asn Thr Lys Lys Lys Val Ser Phe
 115 120 125

Thr Pro Asn Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Lys Leu Glu Lys Asp Ala Leu
 130 135 140

Asp Leu Leu Ser Asp Asn Glu Glu Glu Asp Ala Glu Ser Ser Ile Leu

ES 2 612 741 T3

	<220>		
	<223> cebador		
5	<400> 15		
	gagggatcct ctgctagggga tggataaga g		31
	<210> 16		
	<211> 36		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
15	<400> 16		
	gagggatcca aaatcagaac tgaagcatta atgacc		36
	<210> 17		
20	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> cebador		
	<400> 17		
	gagggatccg aggaaagtga aaagatggca aaag		34
30	<210> 18		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 18		
	gagggatccg agaaattgaa caacctgttg g		31
40	<210> 19		
	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 19		
50	gatccaatga tagtgacaat gatctatcac ttgaagatt ctga		44
	<210> 20		
	<211> 40		
	<212> ADN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
60	<400> 20		
	tcagaaatct tcaagtgata gatcattgtc actatcattg		40

ES 2 612 741 T3

<210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 10 <400> 21
 gagggatcca tggctcttag caaagtcaag ttg 33

 <210> 22
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 22
 ttaactcaaa gctctacatc attatcttt gg 32

 <210> 23
 25 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> cebador

 <400> 23
 ccaaaagata atgatgtaga gctctgactc gagcaccacc acc 43

 35 <210> 24
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> cebador

 <400> 24
 45 ggtggggg ctcgagtcag agctctacat cattatcttt tgg 43

 <210> 25
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>

 <223> epítopo

 55 <400> 25
 catggactac aaggacgacg atgacaagca ctggctatc tctaaaccgc agtag 55

 <210> 26
 <211> 63
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 612 741 T3

<220>
 <223> epítopo

<400> 26

5 tcgactactg cggtttagag atagaccagt gcttgtcatc gtcgtccttg tagtccatga 60
 gct 63

<210> 27
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> epítopo

15 <400> 27
 ccggtctcta ctaacaaagc tgtgtttct ctgagctagt 40

<210> 28
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> epítopo

<400> 28

Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser
 1 5 10

30 <210> 29
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> epítopo

<400> 29

40 ccggactagc tcagagaaac aacagcttg ttagtagaga 40

<210> 30
 <211> 41
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

50 <400> 30
 gatccgatag tgacaatgat ctatcacttg aagatttctg a 41

<210> 31
 <211> 37
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

ES 2 612 741 T3

<400> 31

tcagaaatct tcaagtgata gatcattgtc actatcg

37

5 <210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

220>

10 <223> enlazador

<400> 32

Lys Leu Arg Ile Leu Gln Ser Thr Val Pro Ser Glu Arg Pro Gln Ala
1 5 10 15

Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Thr Thr Arg Gly Pro Val Ala Thr
20 25 30

15

<210> 33

<211> 667

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Proteína de fusión N-GFP

<400> 33

Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly
1 5 10 15

Ser Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp
20 25 30

ES 2 612 741 T3

Gln Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp
 35 40 45

Ser Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu
 50 55 60

Cys Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly
 65 70 75 80

Leu Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr
 85 90 95

Ile Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val
 100 105 110

Asp Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe
 115 120 125

Glu Val Leu Thr Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile
 130 135 140

Glu Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly
 145 150 155 160

Glu Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile
 165 170 175

Ile Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp
 180 185 190

Arg Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys
 195 200 205

Asn Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn
 210 215 220

Ser Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys Tyr Pro His Phe Ile Asp Val Phe
 225 230 235 240

Val His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val
 245 250 255

Glu Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln
 260 265 270

ES 2 612 741 T3

Val Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met
 275 280 285

Leu Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val
 290 295 300

Tyr Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile
 305 310 315 320

Leu Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His
 325 330 335

Phe Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly
 340 345 350

Glu Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys
 355 360 365

Ala Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val
 370 375 380

Leu Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn
 385 390 395 400

Pro Lys Asp Asn Asp Val Leu Glu Leu Lys Leu Arg Ile Leu Gln Ser
 405 410 415

Thr Val Pro Arg Ala Arg Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys
 420 425 430

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 435 440 445

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 450 455 460

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 465 470 475 480

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly
 485 490 495

Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
 500 505 510

ES 2 612 741 T3

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 515 520 525

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 530 535 540

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 545 550 555 560

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 565 570 575

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 580 585 590

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 595 600 605

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
 610 615 620

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 625 630 635 640

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 645 650 655

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 660 665

<210> 34
 <211> 19
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> enlazador
 10 <400> 34

Lys Leu Arg Ile Leu Gln Ser Thr Val Pro Arg Ala Arg Asp Pro Pro
 1 5 10 15

Val Ala Thr

15 <210> 35
 <211> 680
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Proteína de fusión N-GFP
 <400> 35

ES 2 612 741 T3

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

ES 2 612 741 T3

Ser Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys Tyr Pro His Phe Ile Asp Val Phe
 225 230 235 240

Val His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val
 245 250 255

Glu Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln
 260 265 270

Val Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met
 275 280 285

Leu Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val
 290 295 300

Tyr Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile
 305 310 315 320

Leu Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His
 325 330 335

Phe Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly
 340 345 350

Glu Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys
 355 360 365

Ala Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val
 370 375 380

Leu Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn
 385 390 395 400

Pro Lys Asp Asn Asp Val Leu Glu Leu Lys Leu Arg Ile Leu Gln Ser
 405 410 415

Thr Val Pro Ser Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn
 420 425 430

Leu Thr Thr Arg Gly Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu
 435 440 445

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 450 455 460

ES 2 612 741 T3

Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 465 470 475 480
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 485 490 495
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys
 500 505 510
 Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 515 520 525
 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 530 535 540
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 545 550 555 560
 Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 565 570 575
 Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 580 585 590
 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 595 600 605
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 610 615 620
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 625 630 635 640
 His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 645 650 655
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
 660 665 670
 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 675 680

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un complejo proteína N-proteína de interés/proteína P, en el que las proteínas N y P son proteínas de un virus respiratorio sincicial (RSV), dicho procedimiento consta de las siguientes etapas:
 - a) coexpresar una proteína de fusión proteína N de un virus respiratorio sincicial -proteína de interés, con una proteína P truncada del mismo virus respiratorio sincicial, en la que la proteína de interés N se fusiona en fases con el extremo C-terminal de la proteína N, donde la proteína N es una proteína nativa o una proteína N modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, dicha proteína N conserva la capacidad de interactuar con la proteína P, y la proteína P truncada no contiene el dominio de oligomerización P y contiene un dominio de enlace a la proteína N;
 - b) recoger los complejos proteína N-proteína de interés/proteína P que se formen de este modo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el virus respiratorio sincicial es el virus respiratorio sincicial humano.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína P truncada se expresa en forma de una proteína de fusión con una proteína que facilita la purificación de los complejos N-proteína de interés/proteína P.
4. Complejo proteína N-proteína de interés/proteína P en forma de anillos solubles que contienen la proteína de fusión proteína N-proteína de interés con su ARN, las proteínas N y P son proteínas de un virus respiratorio sincicial, en el que la proteína de interés se fusiona en fase al extremo C-terminal de la proteína N, donde la proteína N es una proteína nativa o una proteína N modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, dicha proteína N conserva la capacidad de interactuar con la proteína P, y la proteína P es una proteína truncada del mismo virus respiratorio sincicial que no contiene el dominio de oligomerización P y contiene un dominio de enlace a la proteína N.
5. Complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según la reivindicación 4, en el que la proteína de interés es una proteína marcador, o una proteína de interés vacunal.
6. Complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según la reivindicación 5, en el que la proteína de interés vacunal es un antígeno derivado de un microorganismo patógeno.
7. Complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según la reivindicación 5, en el que la proteína de interés es una construcción que contiene la GFP fusionada en fase, en su extremo C-terminal, con una proteína vacunal.
8. Complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según la reivindicación 4, en el que la proteína de fusión proteína N-proteína de interés es una proteína de fusión N-GFP-proteína de interés que contiene la GFP (Green Fluorescent Protein) fusionada en fase al extremo C-terminal de la proteína N, que incluye una secuencia de unión entre las proteínas N y GFP con la secuencia SEQ ID NO: 32.
9. Procedimiento de preparación de una proteína N de un virus respiratorio sincicial, fusionada en fase con su extremo C-terminal con una proteína de interés, dicho procedimiento consta de la separación de la proteína de fusión proteína N-proteína de interés a partir del complejo proteína N-proteína de interés/proteína P según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
10. Proteína de fusión proteína N-proteína de interés, aislada, estructurada en anillos solubles formada por la proteína de fusión proteína N-proteína de interés con su ARN, que puede obtenerse por el procedimiento según la reivindicación 9, donde la proteína N es una proteína N de un virus respiratorio sincicial nativa o modificada en la región definida por los 25 últimos aminoácidos C-terminales, y la proteína de interés se fusiona en fase, con el extremo C-terminal de la proteína N.
11. Composición farmacéutica que presenta una proteína N de un virus respiratorio sincicial fusionado con una proteína de interés como la que se define en la reivindicación 10 o un complejo de proteína N-proteína de interés/proteína P según se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Composición según la reivindicación 11 que es una composición inmunógena o vacunal.
13. Reactivo diagnóstico que presenta una proteína de fusión según la reivindicación 10, en la que la proteína de

interés es un antígeno.

14. Utilización de una proteína de fusión según la invención 10 que contiene un antígeno fusionado en fase al extremo C-terminal de una proteína N de un virus respiratorio sincicial para la detección in vitro de anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno de la proteína de fusión.

15. Procedimiento de detección de anticuerpos específicos de un antígeno, en una muestra biológica, que consta de los siguientes pasos:

- 10 a) poner en contacto dicha muestra biológica con una proteína de fusión según la reivindicación 10, que contiene un antígeno fusionado en fase al extremo C-terminal de una proteína N de un virus respiratorio sincicial;
- b) detectar los complejos de proteína de fusión N-antígeno/anticuerpo formados, siendo reveladora la presencia de dichos complejos de la presencia de anticuerpos específicos del antígeno en la muestra biológica.

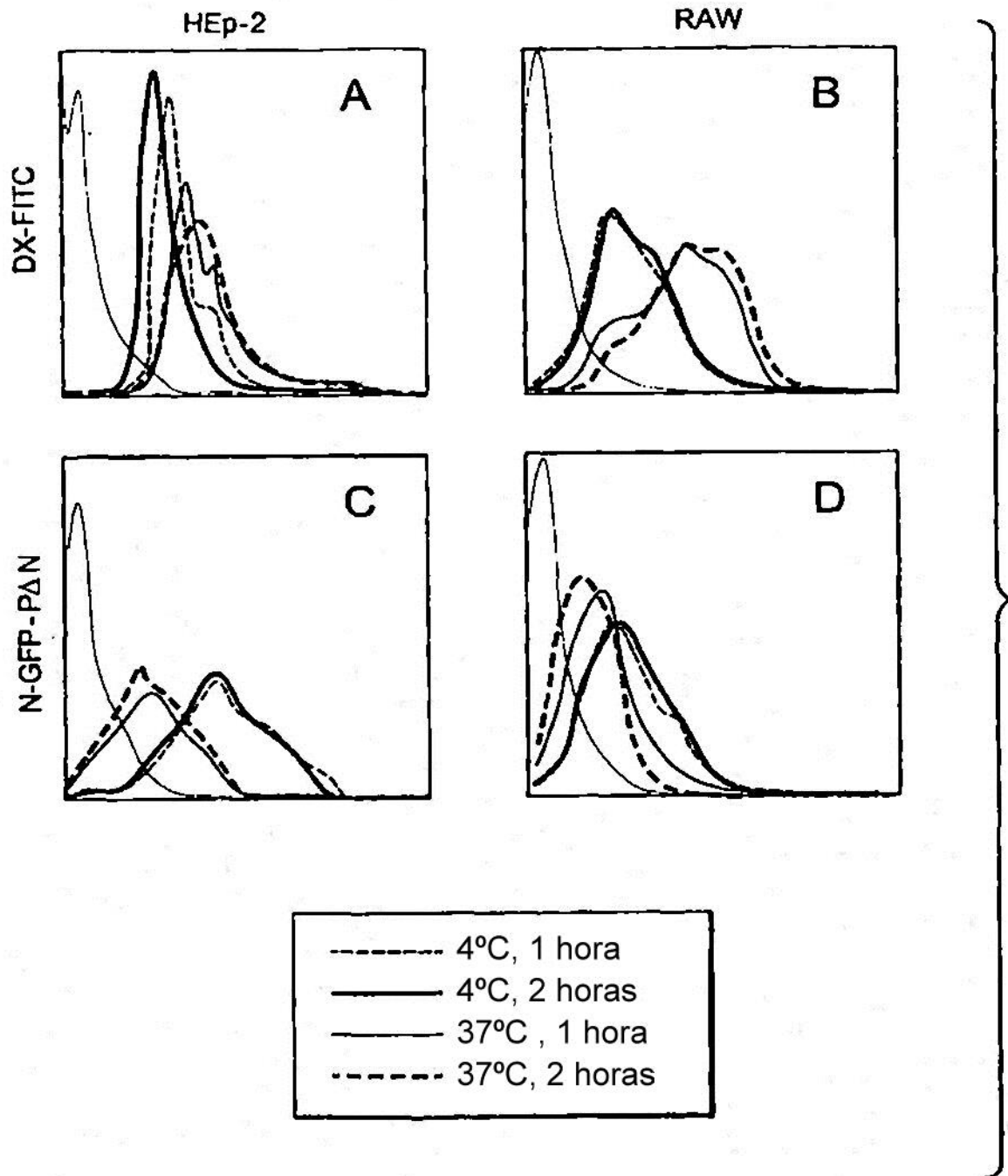


FIG.1

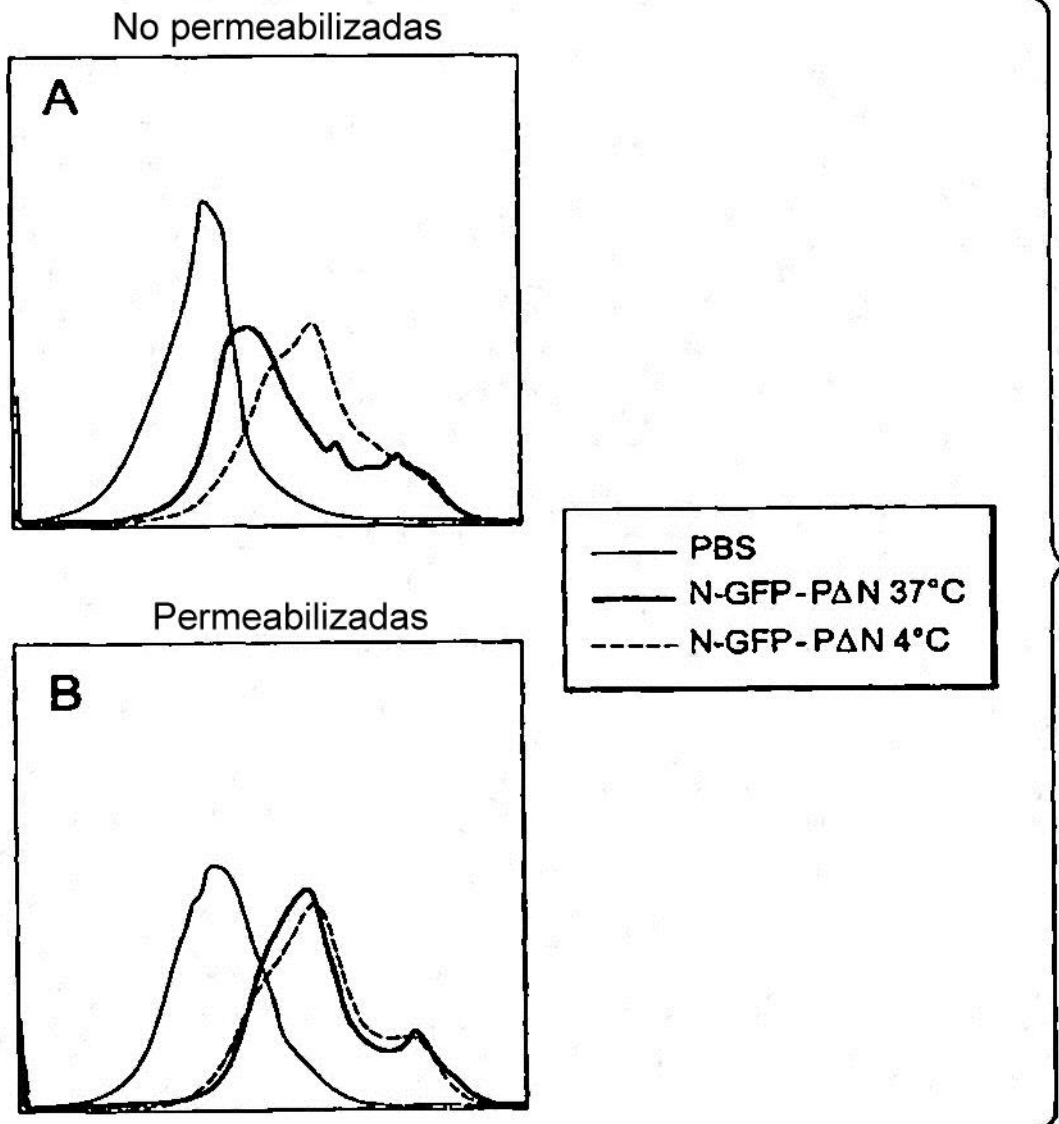


FIG.2

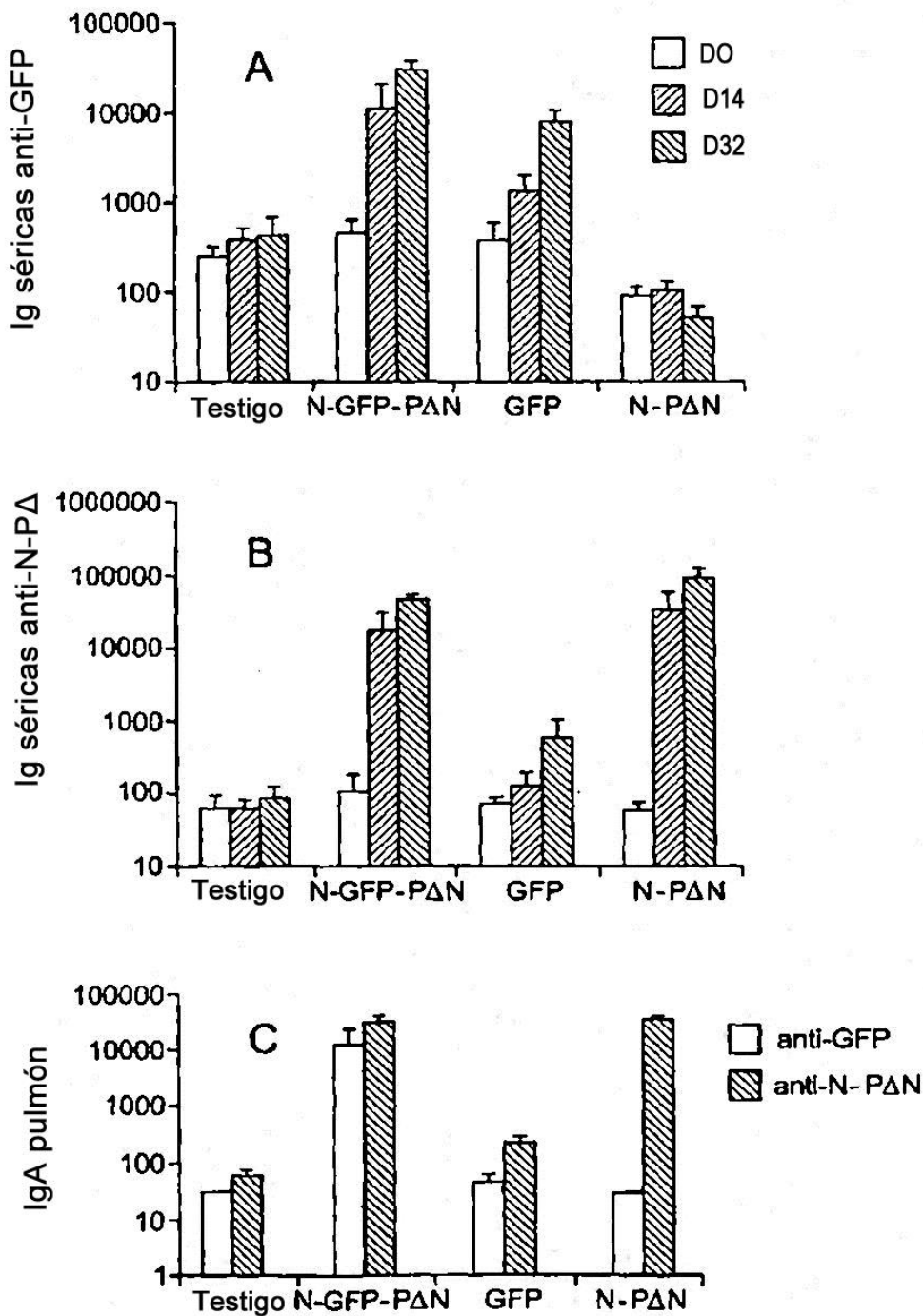


FIG.3

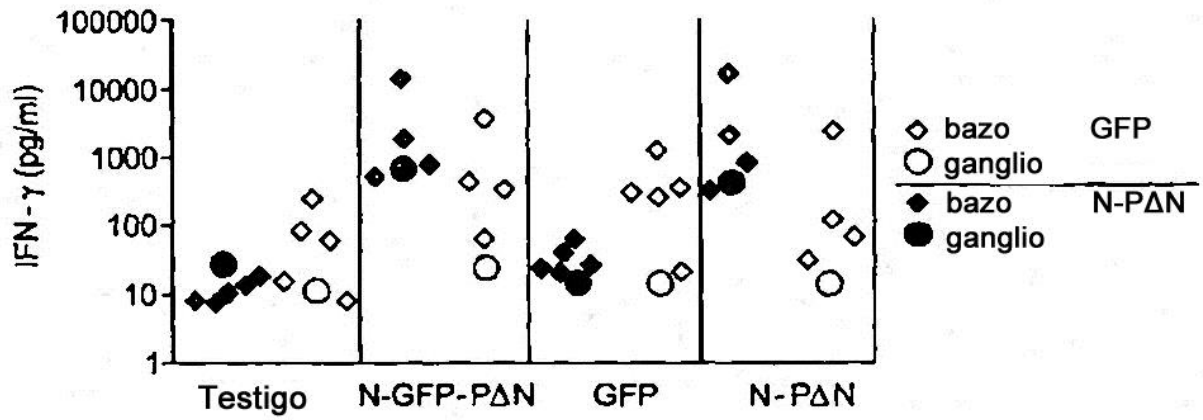


FIG.4