

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 634**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2008 PCT/US2008/087719**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09117035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08873391 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2227483**

54 Título: **Formas solubles de la glucoproteína F del virus de Hendra y Nipah y usos de la misma**

30 Prioridad:

19.12.2007 US 6107 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720 A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**CHAN, YEE-PENG y
BRODER, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 626 634 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

Formas solubles de la glucoproteína F del virus de Hendra y Nipah y usos de la misma

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a formas solubles de la glucoproteína F del virus de Hendra y Nipah, a composiciones que comprenden formas solubles de la glucoproteína F del virus de Hendra y Nipah, a anticuerpos reactivos contra formas solubles de la glucoproteína F del virus de Hendra y Nipah, y a métodos relacionados con los mismos.

Antecedentes de la invención

El virus de Nipah (NiV) y el virus de Hendra (HeV) son virus zoonóticos recientemente emergentes que actualmente comprenden su propio género, *Henipavirus*, dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Los paramixovirus son virus envueltos de ARN de sentido negativo y engloban una variedad de patógenos humanos y animales importantes, que incluyen virus del sarampión, virus de las paperas, virus de Sendai, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus paragripales humanos, virus respiratorio sincitial y virus 5 simio (revisado en Lamb y Parks (2007) *Fields Virology*, eds. Knippe & Howley, Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1449-1496). Los tropismos de gran variedad de especies de los *Henipavirus* y la capacidad de producción de enfermedad mortal en tanto animales como seres humanos distinguen HeV y NiV de todos los otros paramixovirus conocidos (revisado en Eaton (2001) *Microbes Infect* 3:277-278). HeV y NiV son ambos considerados patógenos de nivel de seguridad biológica 4 (BSL-4), y están en la agenda de investigación de biodefensa de NIAID como patógenos de prioridad de categoría C emergentes zoonóticos que podrían usarse potencialmente como agentes para terrorismo biológico. Los *henipavirus* pueden ser fácilmente amplificados en ganado hospedador y pueden además producir enfermedad en animales grandes. Los *henipavirus* pueden ser transmitidos por aerosol a seres humanos donde la enfermedad puede manifestarse como enfermedad respiratoria grave y encefalitis febril. También es posible la transmisión de ser humano a ser humano. Los *henipavirus* pueden ser fácilmente cultivados en tanto cultivo celular como huevos de pollo embrionados, pueden producirse en títulos no concentrados altos ($\sim 10^8$ TCID₅₀/ml) y pueden ser altamente infecciosos (Cramer et al. (2002) *J. Virol. Methods* 99:41-51; Field et al. (2001) *Microbios Infect.* 3:307-314; Hooper et al. (2001) *Microbes Infect* 3:315-322).

Los principales reservorios para tanto NiV como HeV parecen ser varias especies de murciélagos de la fruta pteroides, comunes al sudeste asiático y el Pacífico, y por lo tanto, la mayoría de los brotes virales informados observados hasta la fecha han sido en aquellas áreas (Eaton et al. (2006) *Nat. Rev. Microbiol.* 4:23-35). El HeV apareció por primera vez en Australia en 1994 en dos episodios no relacionados, pero en momento similar, de enfermedad respiratoria grave en caballos, en la que se observaron un total de tres transmisiones a seres humanos, dos de las cuales produjeron la muerte. El HeV reemergió a través de infecciones equinas mortales en Australia en 1999, 2004 y 2006 (Field et al. (2000) *Aust. Vet J.* 78:279-280; Anonymous (2004) *Int. Soc. for Infect. Dis.* 20041214.3307; Murray (2006) *World Org. for Animal Health Vol. 19- No. 26*). El NiV emergió entre 1997 y 1998 en un brote de encefalitis entre criadores de cerdos en tanto Malasia como Singapur; generando 265 informes de infección humana, de los que 105 fueron mortales (Chua (2003) *J. Clin. Virol.* 26:265-275). El NiV reemergió recientemente en Bangladesh. Ocurrieron dos brotes de NiV en 2004, y otro más en enero de 2005 (*Communicable Disease Report Weekly* (2005) Vol. 15 No. 16). Se han hecho varias observaciones importantes en los brotes más recientes, que incluyen mayor incidencia de síndrome disneico agudo, transmisión persona a persona, e índices de letalidad significativamente más altos (que se aproximan al 75 %) (*Health and Science Bulletin* (2004) 2:5-11; Hsu et al. (2004) *Emerg. Infect. Dis.* 10:2082-2087).

Fisiológicamente, los paramixovirus poseen dos glucoproteínas ancladas a membrana importantes en la envuelta de la partícula viral que se requieren para la infección de una célula hospedadora receptiva. Las dos glucoproteínas sirven a funciones diferentes, pero complementarias. Una glucoproteína actúa logrando la unión física con el hospedador, mientras que la otra glucoproteína actúa logrando la fusión eficaz con el hospedador. Normalmente, sin la acción concertada de ambas, el hospedador no puede infectarse.

La glucoproteína de unión es una proteína de membrana de tipo II donde el extremo amino (N-) está orientado hacia el citoplasma y el extremo carboxi (C-) está en el otro lado de la membrana plasmática y en el material extracelular. La glucoproteína de unión puede ser tanto una proteína de hemaglutinina-neuraminidasa (HN), una proteína hemaglutinina (H), como una glucoproteína (G) (que carece de actividades de hemaglutinación y neuraminidasa) dependiendo del virus particular (revisado en Lamb & Parks (2007) *Fields Virology*, eds. Knippe & Howley, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1449-1496). Tradicionalmente, las proteínas HN, H y G son los principales antígenos a los que se dirigen prácticamente todos los anticuerpos neutralizantes. NiV y HeV expresan ambas glucoproteínas G. Estudios previos que se basan en las glucoproteínas G de NiV y HeV han dado vacunas de subunidad eficaces y reactivos de diagnóstico. La función primaria de la proteína de unión del paramixovirus es comprometer receptores apropiados sobre las superficies de células hospedadoras, que para la mayoría de los paramixovirus bien caracterizados, son restos de ácido siálico. La glucoproteína de HeV y NiV, sin embargo, utiliza los receptores de

proteína de células hospedadoras efrina B2 y/o efrina B3 (Bishop et al. (2007) J. Virol. 81:5893-5901; Bonaparte et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 10652-10657; Negrete et al. (2006) PLoS Pathog 2: e7).

La glucoproteína de fusión (F) en paramixovirus media en la fusión de membrana independiente de pH entre el virus y su célula hospedadora, que produce administración de la nucleocápside. Las glucoproteínas F de paramixovirus son glucoproteínas de la envuelta fusogénicas triméricas de clase 1, estando localizado el extremo N de la proteína en el dominio extracelular. Una característica importante de las glucoproteínas F de paramixovirus es la presencia de dos regiones de repetición en héptadas y un péptido de fusión hidrófobo. HeV y NiV infectan mediante un proceso de membrana de fusión independiente de pH en la célula hospedadora por la acción concertada de las glucoproteínas de unión y fusión. En casi todos los casos, ambas glucoproteínas son requeridas para la eficiente fusión de membranas (Bossart & Broder (2007) Viral Entry into Host Cells, eds. Pohlmann & Simmons, Landes Bioscience).

Tras la activación del mecanismo de fusión, las glucoproteínas F experimentarán cambios conformacionales que facilitan la inserción del péptido de fusión en membranas diana. Los cambios conformacionales ponen juntos las dos regiones de repetición en héptadas para la formación de una estructura de haz de seis hélices (también llamado un trímero de horquillas). Estos cambios conformacionales se producen durante o inmediatamente tras la fusión de membranas celulares de virus (revisado en Lamb et al. (2006) Virology 344:30-37). Varios detalles moleculares del cambio conformacional sustancial de la glucoproteína F han sido revelados en las recientes soluciones estructurales de tanto las conformaciones post- como pre-fusión de la glucoproteína F (Yin et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:9288-9293; Yin et al. (2006) Nature 439:38-44).

El estado de la técnica incluye el documento WO2005028673, que desvela, entre otras cosas, una glucoproteína F de virus de Nipah y una glucoproteína F de virus de Hendra.

La investigación en henipavirus es de extrema importancia por al menos dos motivos principales: para conocer más sobre la fisiología de estos virus, y para desarrollar estrategias para tratar, para detectar y para prevenir su brote adicional. Actualmente, los terapéuticos y metodologías para diagnosticar individuos infectados por el NiV o HeV están limitados. Dada la novedad y la amenaza planteada por estos virus, existe la necesidad de medios mejorados para tratar y/o prevenir una infección por NiV o HeV, además de un medio para detectar con exactitud una infección.

Sumario de la invención

La presente invención es la siguiente:

1. Un polipéptido aislado que comprende una forma antigénica soluble de una glucoproteína F del virus de Hendra, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 1 a 488 de SEQ ID NO: 2, o una forma antigénica soluble de una glucoproteína F del virus de Nipah, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 1 a 488 de SEQ ID NO: 4.
2. El polipéptido aislado del punto 1, en el que el polipéptido está fusionado con un segundo polipéptido.
3. El polipéptido aislado del punto 2, en el que el segundo polipéptido comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: un epítipo de péptido S, un sitio de escisión del factor Xa y un dominio de trimerización.
4. El polipéptido aislado del punto 3, donde el dominio de trimerización es SEQ ID NO: 10.
5. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4.
6. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4.
8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo del punto 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un kit de diagnóstico para detectar una infección por henipavirus en un sujeto que comprende el polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, o el anticuerpo del punto 7.
10. Un método de detección de un henipavirus en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con i) el anticuerpo del punto 7 y detectar la unión del anticuerpo, en el que la unión del anticuerpo es indicativa de la presencia de henipavirus en la muestra biológica, o ii) el polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4 y detección de la unión del polipéptido, en el que la unión del polipéptido es indicativa de la presencia de henipavirus en la muestra biológica.

11. Un polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1 a 4 para su uso como un medicamento.

12. Un polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1 a 4 para su uso en la prevención de la infección por un henipavirus.

13. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4 para su uso como un medicamento.

14. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4 para su uso en el tratamiento o la prevención de infección por un henipavirus.

Otros aspectos de la divulgación hecha y las ventajas de la invención se exponen en parte en la descripción, que sigue, y en parte, puede ser obvia de esta descripción, o puede aprenderse de la práctica de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de glucoproteína F soluble (sF) de HeV. Se analizaron 300 µg de glucoproteína sF de HeV en una columna de filtración en gel calibrada Superdex™ 200 10/300. Se recogieron fracciones de 400 µl. El volumen de elución de cada pico se usó para determinar la masa molecular aproximada como se representa a partir de la curva calibrada. Vo indica el volumen vacío.

La Figura 2 muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de la glucoproteína sF de NiV generada después de la escisión por fosfolipasa D de una secuencia GPI del extremo carboxi. La Figura 2A muestra 300 µg de la glucoproteína sF de NiV-GPI analizada en una columna de filtración en gel Superdex™ 200 10/300 calibrada. Entonces se recogieron fracciones de 400 µl. Se usó el volumen de elución de cada pico para determinar la masa molecular aproximada como se representa a partir de la curva calibrada. Vo representa el volumen vacío. La Figura 2B muestra 5 µl de cada fracción después del análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida Blue Native (BN-PAGE), seguido de transferencia Western. Se hizo inmunodetección usando un anticuerpo anti-péptido S conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

La Figura 3 muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de la glucoproteína sF de HeV con un motivo de péptido GCN del extremo carboxi. La Figura 3A muestra 4 mg de la glucoproteína sF de HeV-GCN analizada en una columna de filtración en gel Superdex™ 200 10/300 calibrada. Se recogieron fracciones de 400 µl. El volumen de elución de cada pico se usó para determinar la masa molecular aproximada como se representa a partir de la curva calibrada. Vo indica el volumen vacío. La Figura 3B muestra 2 µl de cada fracción analizada por BN-PAGE, seguido de transferencia Western. La detección se hizo usando anticuerpo anti-péptido S conjugado con HRP.

La Figura 4 muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de la glucoproteína sF de NiV con un motivo de péptido GCN del extremo carboxilo. La Figura 4A muestra 3 mg de la glucoproteína sF de NiV-GCN analizada en una columna de filtración en gel Superdex™ 200 10/300 calibrada. Se recogieron fracciones de 400 µl. El volumen de elución de cada pico se usó para determinar la masa molecular aproximada como se representa a partir de la curva calibrada. Vo indica el volumen vacío. La Figura 4B muestra 2 µl de cada fracción analizada por BN-PAGE seguido de transferencia Western. La detección se hizo usando anticuerpo anti-péptido S conjugado con HRP.

Las Figuras 5A-5B muestran análisis de BN-PAGE de la glucoproteína sF. En el carril 1, se cargó la glucoproteína sF de HeV-GCN. En el carril 2, se cargó la glucoproteína sF de NiV-GCN. En el carril 3, se cargó la glucoproteína sF de HeV. En el carril 4, se cargó la glucoproteína sF de NiV-GPI. La Figura 5A muestra una transferencia Western de aproximadamente 2 µg de proteína cargada por carril. La inmunodetección se hizo usando anticuerpo anti-péptido S conjugado con HRP. La Figura 5B muestra tinción con azul de Coomassie de aproximadamente 5 µg de proteína cargada por carril.

Las Figuras 6A-6C muestran la valoración por ELISA de suero de ratones inmunizados con diferente proteína sF como se indica en la Tabla 1. Las placas se recubrieron con 50 ng de sF de HeV (Figura 6A) o NiV (Figura 6B) GCN por pocillo, seguido de bloquear en 5 % de BSA, PBS, 0,05 % de Tween 20. Se llevó a cabo la dilución sucesiva doble a partir de 1/2000 de cada suero de ratón; mAb D54 contra envuelta del VIH-1-GCN, anticuerpo anti-péptido S y anticuerpo policlonal anti-F1 de HeV de conejo. Se usó anti-IgG de ratón conjugada con HRP como anticuerpo secundario. Cada valoración de suero se hizo por duplicado y los valores de DO promedio se representaron contra la dilución de suero en valores logarítmicos. Se usó envuelta del VIH-1-GCN (Figura 6C) para monitorizar el título de anticuerpo generado contra la cola de GCN.

La Figura 7 muestra la inmunoprecipitación de F de HeV o NiV de longitud completa por diferente suero de ratón. Se infectaron células HeLa USU con virus de la variolovacuna recombinante que expresa F de HeV o NiV de longitud completa con MOI de 10 durante 24 horas. Las células se lisaron y se purificaron por centrifugación. Los lisados se dividieron entonces igualmente en 7 porciones. Cada fracción de lisado celular se añadió entonces a 1

5 μ l de suero de diferente ratón inmunizado con diferentes sF como se indica en la Tabla 1. La mezcla se rotó a 4 °C, durante la noche seguido de precipitación de perlas de proteína-G a temperatura ambiente durante 1 h. Entonces, el complejo unido se lavó 3 veces y posteriormente se hirvió en 50 μ l de tampón de carga de muestra de SDS-PAGE en condición reductora. Entonces se analizaron 25 μ l de las muestras hervidas en SDS-PAGE, seguido de transferencia Western. La glucoproteína F precipitada se detectó usando anticuerpo policlonal anti-F1 de HeV de conejo (-vo indica suero pre-inmunización reunido).

10 La Figura 8 muestra la neutralización de suero de virus indicador de luciferasa pseudotipificado de F y G de NiV. Las partículas de pseudovirus de F y G de NiV que alojan el gen indicador de luciferasa NL43 se pre-incubaron con el suero de ratón en dilución 1/200, 1/400 y 1/800 (izquierda a derecha) a temperatura ambiente durante ½ h. Entonces, las células 293T se infectaron con la mezcla durante 48 h. Entonces, las células se lisaron y se midió la actividad de luciferasa. Cada infección se hizo por triplicado (-vo indica suero pre-inmunización reunido).

15 La Figura 9 muestra los datos de sedimentación en equilibrio representativos (6.000 rpm) de sF de HeV-GCN (1,5 mg/ml) en PBS con tampón al 0,01 % de Triton X-100 a 4 °C. Los datos se representan como absorbancia frente al radio del eje de rotación. Los datos se ajustan estrechamente a un complejo trimérico. Se representa la desviación en los datos del ajuste lineal para un modelo trimérico (superior).

20 Descripción detallada

25 El virus de Hendra (HeV) y el virus de Nipah (NiV) son miembros estrechamente relacionados del género *henipavirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Estos virus infectan células por un evento de fusión de membranas independiente del pH mediado por sus glucoproteínas de la envuelta (Envs) de unión (G) y fusión (F). La presente invención proporciona formas solubles específicas de la glucoproteína F de HeV y NiV y aspectos relacionados como se explica en las reivindicaciones. La invención proporciona formas solubles de la glucoproteína F de HeV y NiV que retienen características de la glucoproteína F nativa.

30 La fisiología natural de la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína F previene que la proteína sea soluble en soluciones acuosas. La presente invención proporciona formas solubles de las glucoproteínas F de HeV y NiV que comprenden todo o parte del dominio extracelular de la glucoproteína F de un HeV o NiV. Las formas solubles de la glucoproteína F pueden producirse delecionando todo o parte de los dominios de la cola transmembranaria y citoplásmica de la glucoproteína F. A modo de ejemplo, una glucoproteína F soluble puede comprender la región extracelular completa de una glucoproteína F de HeV o NiV. Por tanto, a modo de ejemplo, una glucoproteína F soluble puede comprender toda o parte de la región extracelular y parte del dominio transmembranario de una glucoproteína F de HeV o NiV. A modo de ejemplo adicional, se construyeron varias versiones de una glucoproteína F soluble (sF), principalmente mediante eliminación de la cola citoplásmica y/o dominio transmembranario que anclan la proteína. Sin estas regiones, la glucoproteína F expresada resultante es soluble.

40 Las glucoproteínas sF de la invención son estructuralmente similares a la glucoproteína F viral nativa. A modo de ejemplo, las glucoproteínas sF de la invención pueden ser reconocidas por anticuerpos policlonales dirigidos a HeV y/o NiV. A modo de ejemplo, las glucoproteínas sF de la invención pueden ensamblarse en la forma oligomérica o formas (tal como un trímero), comparable a la glucoproteína F de NiV y HeV nativa.

45 Las glucoproteínas sF de la presente invención son adecuadas, por ejemplo, para el desarrollo de vacunas y para actuar como un antígeno para generar anticuerpos antivirales cuando se usan como vacuna o en el aislamiento de anticuerpos monoclonales recombinantes. Las glucoproteínas sF son adecuadas para generar anticuerpos capaces de reconocer la glucoproteína F nativa. Las glucoproteínas sF de la presente invención que se ensamblan en formas oligoméricas, tales como trímeros, pueden ser de uso adicional, tal como, por ejemplo, para la cristalización y determinación estructural para proporcionar información adicional para ayudar en la investigación antiviral basada en estructural. Las formas oligoméricas de la glucoproteína sF de la presente invención pueden también generar anticuerpos adicionales capaces de reconocer la glucoproteína F nativa y sus formas oligoméricas nativas. Ejemplos de metodología que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, los ensayos descritos en el presente documento en los ejemplos.

55 Como se usa en el presente documento, la forma singular "un" o "una" o "el" o "la" incluye referencias al plural, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, "una" glucoproteína F incluye una o más glucoproteínas F.

60 Como se usa en el presente documento, "glucoproteína F soluble" o "forma soluble de la glucoproteína F" o "glucoproteína sF" se refiere a una secuencia de aminoácidos correspondiente a un fragmento o porción de la glucoproteína F nativa que contiene el dominio extracelular o una porción del mismo. La glucoproteína sF es estructuralmente similar a la glucoproteína F viral nativa. A modo de ejemplo, la eliminación de un dominio transmembranario aumenta la solubilidad.

65 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Los anticuerpos son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la ciencia de la inmunología.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa no solo las moléculas de anticuerpo de longitud completa, sino también fragmentos de moléculas de anticuerpo que retienen la capacidad de unión al antígeno. Tales fragmentos también son muy conocidos en la técnica y se emplean regularmente tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa no solo moléculas de inmunoglobulina de longitud completa, sino también fragmentos activos de unión al antígeno tales como los fragmentos activos muy conocidos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd.

Como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad del virus de Hendra" y "enfermedad del virus de Nipah" se refieren a enfermedades causadas, directamente o indirectamente, por infección con el virus de Hendra o Nipah. Los tropismos de gran variedad de especies y la capacidad para producir enfermedad mortal en tanto animales como seres humanos han distinguido el virus de Hendra (HeV) y el virus de Nipah (NiV) de todos los otros paramixovirus conocidos (Eaton (2001) *Microbes. Infect.* 3:277-278). Estos virus pueden amplificarse y producir enfermedad en animales grandes y pueden transmitirse a seres humanos donde la infección se manifiesta como una enfermedad respiratoria grave y/o encefalitis febril.

Como se usa en el presente documento con respecto a las proteínas y polipéptidos, el término "recombinante" puede incluir proteínas y/o polipéptidos y/o péptidos que se producen o derivan por ingeniería genética, por ejemplo por traducción en una célula de ácido nucleico no nativo o que se ensamblan por medios o mecanismos artificiales.

Como se usa en el presente documento con respecto a los polipéptidos y proteínas, el término "aislado" puede incluir un polipéptido o ácido nucleico que, por la mano del hombre, existe separado de su entorno nativo y no es, por tanto, un producto de la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo, tal como, por ejemplo, una célula hospedadora recombinante.

Como se usa en el presente documento, el término "análogo" puede incluir cualquier polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido, o péptido, de la invención, en el que uno o más restos han sido conservativamente sustituidos con un resto funcionalmente similar, y adicionalmente que muestran aspectos funcionales sustancialmente idénticos de los polipéptidos como se describen en el presente documento. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen sustitución de un resto no polar (hidrófobo) por otro (por ejemplo, isoleucina, valina, leucina o metionina) por otro, sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro (por ejemplo entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina), sustitución de un resto básico por otro (por ejemplo lisina, arginina o histidina), o sustitución de un resto ácido por otro (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico).

Como se usa en el presente documento, un "homólogo" puede incluir cualquier polipéptido que tiene una estructura terciaria sustancialmente idéntica a un polipéptido de la invención que también muestra las propiedades funcionales de los polipéptidos como se describen en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el "dominio de trimerización" se refiere a un motivo estructural que ayuda en la polimerización de proteínas expresadas. Los dominios de trimerización pueden ayudar a las proteínas solubles a configurar como si se unieran a la membrana. Los dominios de trimerización, por ejemplo, pueden usar motivos de superenrollamiento a polimerizar. Se observa un ejemplo de un dominio de trimerización en la cremallera de leucina básica. Las cremalleras de leucina básicas normalmente se correlacionan con un superenrollamiento de hélices α , por lo que el posicionamiento de leucina, u otros aminoácidos hidrófobos, en las hélices interaccionan para formar un núcleo hidrófobo. Un ejemplo de una cremallera de leucina básica es GCN4.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" puede incluir cualquier tipo de intervención usada en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento puede incluir, pero no se limita a, administración de, por ejemplo, una composición farmacéutica, sola o en combinación con otras modalidades de tratamiento generalmente conocidas en la técnica. El "tratamiento" puede realizarse profilácticamente, o posterior al inicio de un evento patológico.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite que el componente retenga la actividad biológica y es no reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Ejemplos pueden incluir, pero no se limitan a, vehículos farmacéuticos estándar tales como una solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua, emulsiones, y diversos tipos de agentes humectantes.

Como se usa en el presente documento, "fusión" puede referirse a ácidos nucleicos y polipéptidos que comprenden secuencias que no se encuentran naturalmente asociadas entre sí en el orden o contexto en el que se ponen según la presente invención. Un ácido nucleico o polipéptido de fusión no comprende necesariamente la secuencia natural del ácido nucleico o polipéptido en su totalidad. Las proteínas de fusión tienen los dos o más segmentos unidos juntos mediante enlaces peptídicos normales. Los ácidos nucleicos de fusión tienen los dos o más segmentos unidos juntos mediante enlaces fosfodiéster normales.

Como se usa en el presente documento, el "sujeto" puede incluir el receptor del tratamiento que va a ponerse en práctica según la invención. El sujeto puede ser cualquier animal, que incluye un vertebrado. El sujeto será en la mayoría de los casos, preferentemente un ser humano, pero también puede ser ganado doméstico, animal de laboratorio (que incluye, pero no se limita a, roedores tales como una rata o ratón) o animal de compañía.

Como se usa en el presente documento, "escisión" puede referirse al corte de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos. A modo de ejemplo, la escisión puede producirse con el uso de enzimas, tales como tripsina y quimotripsina. A modo de ejemplo adicional, pueden escindirse secuencias de nucleótidos con el uso de endonucleasas de restricción.

Los virus de Nipah y de Hendra requieren la acción concertada de glucoproteínas de unión y fusión para infectar la célula hospedadora e insertarse en la nucleocápside. La presente invención proporciona una forma soluble de la glucoproteína F de tanto los virus de Nipah como de Hendra. Por ejemplo, la ausencia de las regiones citoplásmicas y transmembranarias del extremo carboxilo de la glucoproteína F permiten la solubilización de la proteína. Como ejemplo adicional, el uso de los primeros 488 aminoácidos de NiV y HeV (una pérdida de 58 aminoácidos en ambos), produce una versión soluble de la glucoproteína F que retiene características de la proteína nativa. La presente invención incluye polipéptidos como se define en la reivindicación 1.

Formas solubles de la glucoproteína F de NiV y HeV

La presente invención proporciona formas solubles de la glucoproteína F de NiV y HeV de diferentes cepas. La presente invención proporciona formas solubles de la glucoproteína F que comprende una secuencia de aminoácidos con homología significativa con las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular de las glucoproteínas F nativas del virus de Hendra y de Nipah, es decir, las formas solubles de la glucoproteína F tienen al menos el 90 % de identidad con la glucoproteína F de NiV o HeV soluble nativa de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 2. En una realización, el polipéptido comprende SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Las glucoproteínas sF pueden englobar inserciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos que tienen efecto de mínimo a ninguno sobre la actividad, función o forma del polipéptido. Ejemplos de tales sustituciones incluyen la sustitución de un resto no polar por otro, la sustitución de un resto polar por otro, la sustitución de un resto básico por otro, o la sustitución de un resto ácido por otro. Las glucoproteínas sF pueden incluir además inserciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos en una comparación con la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la glucoproteína FNiV o HeV nativa que da efecto mínimo sobre la actividad, función y/o estructura de polipéptidos. Aquellos expertos en la materia reconocerán que también pueden usarse aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, beta-alanina (beta-Ala), u otros omega-aminoácidos, tales como 3-aminopropiónico, 2,3-diaminopropiónico (2,3-diaP), 4-aminobutírico, etc., ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), sarcosina (Sat), ornitina (Orn), citrulina (Cit), t-butilalanina (t-BuA), t-butilglicina (t-BuG), N-metilisoleucina (N-Melle), fenilglicina (Phg) y ciclohexilalanina (Cha), norleucina (Nle), ácido cistéico (Cya) 2-naftilalanina (2-Nal); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (Tic); beta-2-tienilalanina (Thi); y sulfóxido de metionina (MSO).

La glucoproteína sF de la presente invención puede prepararse por cualquier técnica conocida. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse mediante ingeniería genética. A modo de ejemplo, la traducción de ADN recombinante. Los polipéptidos también pueden prepararse sintéticamente. A modo de ejemplo, el polipéptido puede sintetizarse usando la técnica sintética en fase sólida inicialmente descrita por Merrifield (J. Am Chem. Soc. 85:2149-2154), que se incorpora en el presente documento por referencia. Otras técnicas de síntesis de polipéptidos pueden encontrarse, por ejemplo, Kent et al. (1985) en *Synthetic Peptides in Biology and Medicine*, eds. Alitalo et al., Elsevier Science Publishers, 295-358.

La glucoproteína sF de la presente invención puede aislarse u obtenerse en forma sustancialmente pura. Sustancialmente puro significa que las proteínas y/o polipéptidos y/o péptidos están esencialmente libres de otras sustancias con las que puede encontrarse en la naturaleza o sistemas *in vivo* a un grado práctico y apropiado para su uso previsto. En particular, las glucoproteínas sF son suficientemente puras y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células hospedadoras de manera que sean útiles en, por ejemplo, generar anticuerpos, secuenciar o producir preparaciones farmacéuticas. Por técnicas muy conocidas en la técnica, pueden producirse polipéptidos sustancialmente puros en vista de las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos desveladas en el presente documento. Debido a que un polipéptido sustancialmente purificado de la invención puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido puede comprender solo un cierto porcentaje en peso de la preparación. El polipéptido está, sin embargo, sustancialmente puro porque ha sido sustancialmente separado de las sustancias con las que puede asociarse en sistemas vivos.

Polipéptido de fusión que comprende glucoproteína F soluble

La presente invención proporciona además polipéptidos de fusión aislados de las glucoproteínas sF de la invención con polipéptidos adicionales. Los polipéptidos adicionales pueden ser fragmentos de un polipéptido más grande. Uno, dos, tres, cuatro, o más polipéptidos adicionales, pueden fusionarse con la glucoproteína sF. Los polipéptidos adicionales pueden ser hacia el extremo amino de la glucoproteína sF. Los polipéptidos adicionales pueden

fusionarse hacia el extremo carboxilo de la glucoproteína sF. Los polipéptidos adicionales pueden flanquear la glucoproteína sF.

- 5 Los polipéptidos adicionales pueden ayudar en la estabilización, estructura y/o la purificación de la glucoproteína sF. Los polipéptidos adicionales pueden asistir a la glucoproteína sF para formar oligómeros, tales como un trímero. Los oligómeros pueden asistir a las glucoproteínas sF para configurarse de un modo más similar a la glucoproteína F nativa. A modo de ejemplo, un dominio de trimerización fusionado con la glucoproteína sF puede estabilizar el polipéptido y puede además aumentar la polimerización del polipéptido.
- 10 Los polipéptidos adicionales pueden comprender un epítipo. Los polipéptidos adicionales pueden comprender una marca de afinidad. A modo de ejemplo, la fusión de un polipéptido que comprende un epítipo y/o una marca de afinidad con la glucoproteína sF puede ayudar en la purificación y/o identificación del polipéptido. A modo de ejemplo, el segmento de polipéptido puede ser una marca de His, una marca de myc, una marca de péptido S, una marca de MBP (proteína de unión a maltosa), una marca de GST (glutatión S-transferasa), una marca de FLAG, una marca de tiorredoxina, una marca de GFP (proteína verde fluorescente), una BCCP (proteína transportadora de carboxilo de biotina), una marca de calmodulina, una marca de Strep, una marca de epítipo de HSV, una marca de epítipo de V5 y una marca de CBP. El uso de tales epítipos y marcas de afinidad es conocido para aquellos expertos en la materia.
- 15
- 20 Los polipéptidos adicionales pueden proporcionar una proteína de fusión que comprende sitios para la escisión del polipéptido. Como un ejemplo, un polipéptido puede escindirse mediante hidrólisis del enlace peptídico. La escisión puede realizarse por una enzima. La escisión puede producirse en la célula. La escisión puede producirse mediante manipulación artificial y/o introducción artificial de una enzima de escisión. A modo de ejemplo, las enzimas de escisión pueden incluir pepsina, tripsina, quimotripsina y/o factor Xa. Los polipéptidos adicionales pueden proporcionar un dominio de anclaje a membrana. El dominio de anclaje a membrana puede ser un sitio para la escisión. Por ejemplo, la fosfolipasa D escindirá el dominio de anclaje a membrana de SEQ ID NO: 8. Además, la escisión permite la facilidad de aislar la glucoproteína sF de los polipéptidos. La escisión puede también permitir el aislamiento de la glucoproteína sF fusionada con los polipéptidos de otros polipéptidos. A modo de ejemplo, un sitio de escisión del factor Xa puede permitir el aislamiento de la glucoproteína sF fusionada con un dominio de trimerización de una marca de péptido S. La presente invención proporciona las glucoproteínas sF de la invención fusionadas con un dominio de trimerización, un dominio de escisión de factor Xa o una marca de péptido S. El dominio de trimerización permite la asociación de la glucoproteína sF como un oligómero. La marca de péptido S permite la purificación mediante el uso de anticuerpos anti-péptido S. El dominio de escisión del factor Xa permite la separación de la glucoproteína sF fusionada con el dominio de trimerización de la marca de péptido S.
- 25
- 30
- 35 Los polipéptidos de fusión pueden poseer además modificaciones estructurales adicionales no compartidas con el mismo péptido orgánicamente sintetizado, tales como adenilación, carboxilación, glucosilación, hidroxilación, metilación, fosforilación o miristilación. Estas modificaciones estructurales añadidas pueden seleccionarse adicionalmente o preferirse por la elección apropiada de sistema de expresión recombinante. Por otra parte, los polipéptidos de fusión pueden tener su secuencia extendida por los principios y la práctica de la síntesis orgánica.
- 40

Ácidos nucleicos que codifican formas solubles de la glucoproteína F

- 45 La presente invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos de las formas solubles de las glucoproteínas F de NiV o HeV de la invención. Los ácidos nucleicos pueden incluir formas individuales o bicatenarias de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o polímeros de los mismos.
- 50 La presente invención también proporciona un vector que comprende un ácido nucleico tal. Un vector puede ser cualquiera de varios ácidos nucleicos en los que puede insertarse una secuencia deseada por restricción y ligación para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para la expresión en una célula hospedadora. Vectores normalmente están compuestos de ADN, aunque vectores de ARN también están disponibles. Vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es uno que es capaz de duplicarse en una célula hospedadora, y que se caracteriza además por uno o más sitios de restricción de endonucleasa en la que el vector puede cortarse en un modo determinable y en el que una secuencia de ADN deseada puede ligarse de forma que el nuevo vector recombinante retenga su capacidad para duplicarse en la célula hospedadora. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces a medida que el plásmido aumenta en número de copias dentro de la bacteria hospedadora o solo una única vez por hospedador antes de que el hospedador se reproduzca por mitosis. En el caso de fago, la replicación puede producirse activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica.
- 55
- 60 Los vectores pueden contener además una secuencia promotora. Un promotor puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos no traducida normalmente localizada en la dirección 5' de la región codificante que contiene el sitio para iniciar la transcripción del ácido nucleico. La región promotora también puede incluir otros elementos que actúan de reguladores de la expresión génica. En realizaciones adicionales de la invención, el vector de expresión contiene una región adicional para ayudar en la selección de células que tienen el vector de expresión incorporado. La secuencia promotora está frecuentemente limitada (inclusivamente) en su extremo 3' por el sitio de iniciación de
- 65

la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del ruido de fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción, además de dominios de unión a proteína responsables de la unión de ARN polimerasa. Promotores eucariotas contendrán frecuentemente, pero no siempre, cajas "TATA" y cajas "CAT".

Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras adecuadas para su uso en la identificación y selección de células que han sido transformados o transfectadas con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen tanto la resistencia como la sensibilidad a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables por ensayos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que visiblemente afectan el fenotipo de células transformadas o transfectadas, hospedadores, colonias o placas. Vectores preferidos son aquellos capaces de replicación y expresión autónomas de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN con los que están operativamente unidos.

Un vector de expresión es uno en el que una secuencia de ácidos nucleicos deseada puede insertarse por restricción y ligación de forma que se una operativamente a las secuencias reguladoras y pueda expresarse como un transcrito de ARN. Expresión se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno, transgén o región codificante en una célula.

Una secuencia codificante y secuencias reguladoras están operativamente unidas cuando se unen covalentemente de tal forma que pongan la expresión o transcripción de la secuencia codificante bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes sean traducidas en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están operativamente unidas si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' produce la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) produce la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias codificantes, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente que va a traducirse en una proteína. Así, una región promotora estaría operativamente unida a una secuencia codificante si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de forma que el transcrito resultante pudiera traducirse en la proteína deseada o polipéptido.

La presente divulgación incluye la transformación y/o transfección de ácido nucleico que codifica la glucoproteína sF. Transformación es la introducción de ácido nucleico exógeno o heterólogo al interior de una célula procarionota. Transfección es la introducción de ácido nucleico exógeno o heterólogo al interior de una célula eucariota. El ácido nucleico transformante o transfectante puede o puede no integrarse (unirse covalentemente) en ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procarionotas, por ejemplo, el ácido nucleico transformante puede mantenerse en un elemento episómico tal como un plásmido o vector viral. Con respecto a las células eucariotas, una célula establemente transfectada es una en la que el ácido nucleico transfectante ha llegado a integrarse en un cromosoma de manera que sea heredado por células hija mediante replicación de cromosomas. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones comprendidos en una población de células hija que contienen el ácido nucleico transfectado.

Pueden usarse cultivos celulares de eucariotas superiores para expresar las proteínas de la presente invención, tanto de células de vertebrado como de invertebrado, que incluyen insectos, y se conocen procedimientos de propagación de los mismos (véase, por ejemplo, Kruse et al. (1973) Tissue Culture, Academic Press).

Células hospedadoras adecuadas para expresar los polipéptidos de la presente invención en eucariotas superiores incluyen: 293 (riñón embrionario humano) (ATCC GRL-1573); 293F (Invitrogen, Carlsbad CA); 293T y 293T/17 de derivado (293tsA1609neo y ATCC CRL-11268 de derivado) (riñón embrionario humano transformado por antígeno de SV40 T); COS-7 (línea CVI de riñón de mono transformada por SV40)(ATCC CRL1651); BHK (células de riñón de hámster bebé) (ATCC CRL10); CHO (células de ovario de hámster chino); células de Sertoli de ratón; CV1 (células de riñón de mono) (ATCC CCL70); VERO76 (células de riñón de mono verde africano) (ATCC CRL1587); HeLa (células de carcinoma cervical humano) (ATCC CCL2); MDCK (células de riñón canino) (ATCC CCL34); BRL3A (células de hígado de rata búfalo) (ATCC CRL1442); W138 (células de pulmón humano) (ATCC CCL75); HepG2 (células de hígado humano) (HB8065); y MMT 060652 (tumor mamario de ratón) (ATCC CCL51).

La presente invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden las glucoproteínas sF de la invención y polipéptidos adicionales. Vectores útiles para construir sistemas de expresión eucariotas para la producción de polipéptidos de fusión comprenden ácido nucleico que codifica la proteína de fusión operativamente unida a una secuencia de activación transcripcional apropiada, tal como un promotor y/u operador. Otras características típicas pueden incluir sitios de unión a ribosoma apropiados, codones de terminación, potenciadores, terminadores, o elementos de replicón. Estas características adicionales pueden insertarse en el vector en el sitio o sitios apropiados por técnicas de corte y empalme convencionales tales como digestión y ligación con endonucleasa de restricción.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden codificar una proteína de fusión que comprende ácidos nucleicos fusionados con un ácido nucleico que codifica una glucoproteína sF. El ácido nucleico fusionado puede codificar polipéptidos que pueden ayudar en la purificación y/o inmunogenicidad y/o estabilidad sin desplazar el marco de lectura del codón de la glucoproteína sF. El ácido nucleico fusionado puede codificar un polipéptido para ayudar en la purificación de la glucoproteína sF. El ácido nucleico fusionado puede codificar un epítipo y/o una marca de afinidad. Ejemplos de polipéptidos que ayudan en la purificación incluyen, pero no se limitan a, una marca de His, una marca de myc, una marca de péptido S, una marca de MBP, una marca de GST, una marca de FLAG, una marca de tiorredoxina, una marca de GFP, una BCCP, una marca de calmodulina, una marca de Strep, una marca de epítipo de HSV, una marca de epítipo de V5 y una marca de CBP.

El ácido nucleico fusionado puede codificar un polipéptido que se correlaciona con un sitio dirigido a, o propenso a, escisión. El ácido nucleico fusionado puede codificar polipéptidos que son sitios de escisión enzimática. La escisión enzimática puede ayudar en aislar la glucoproteína sF, además de otros segmentos de polipéptido fusionado, de aún otros polipéptidos. A modo de ejemplo, un ácido nucleico intermedio que codifica un sitio de escisión enzimático puesto entre ácidos nucleicos que codifican la glucoproteína sF y un epítipo de péptido S permitirá la posterior separación de la glucoproteína sF expresada y el péptido S. El ácido nucleico fusionado puede codificar en parte aminoácidos que son un sitio de escisión por el factor Xa. El ácido nucleico fusionado puede codificar aminoácidos que están anclados en la membrana y un sitio de escisión. A modo de ejemplo, SEQ ID NO: 8 anclará el polipéptido de fusión a la membrana plasmática y es un sitio para la escisión de fosfolipasa D.

El ácido nucleico fusionado puede codificar en parte un polipéptido que ayuda en la estabilidad y función de la glucoproteína F soluble. El ácido nucleico fusionado puede codificar polipéptidos que ayudan en la formación de oligómeros de glucoproteína F soluble. El ácido nucleico fusionado puede codificar un dominio de trimerización. Un motivo de cremallera de leucina básica es un ejemplo de un dominio de trimerización. A modo de ejemplo adicional, el motivo de cremallera de leucina básica es un segmento de polipéptido GCN4.

Los múltiples ácidos nucleicos pueden fusionarse con el ácido nucleico que codifica la glucoproteína sF. Los ácidos nucleicos fusionados pueden codificar polipéptidos que ayudan en la purificación y/o escisión enzimática y/o estabilidad. Los ácidos nucleicos fusionados no pueden alargar el polipéptido expresado significativamente. Los ácidos nucleicos fusionados pueden codificar menos de sesenta aminoácidos adicionales para la glucoproteína sF. El ácido nucleico fusionado puede seguir al ácido nucleico que codifica la glucoproteína sF. Los ácidos nucleicos fusionados pueden preceder al ácido nucleico que codifica la glucoproteína sF. Los ácidos nucleicos fusionados pueden flanquear el ácido nucleico que codifica la glucoproteína sF. El ácido nucleico fusionado que codifica una secuencia de aminoácidos propensa a la escisión enzimática puede ponerse entre el ácido nucleico que codifica la región de glucoproteína sF y otro ácido nucleico fusionado que codifica un polipéptido para ayudar en la purificación. La molécula de ácido nucleico puede disponerse de manera que un dominio de escisión separe un polipéptido para ayudar en la purificación de la glucoproteína sF fusionada con un dominio de trimerización.

Anticuerpos que se unen a formas solubles de la glucoproteína F

Otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos. Anticuerpos de la presente invención son aquellos específicos para la glucoproteína F de HeV o específicos para la glucoproteína F de NiV. Anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con la glucoproteína F de HeV y la glucoproteína F de NiV y anticuerpos neutralizantes forman parte de la divulgación. Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse usando métodos muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, que incluye variantes de glucosilación de anticuerpos, variantes de la secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos covalentemente modificados. Anticuerpos preferidos se derivan de origen murino, de rata, humano, primate, o cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos y humanizados).

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Métodos de preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales son muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos pueden humanizarse por métodos conocidos en la técnica. Un anticuerpo humanizado es una molécula de inmunoglobulina que contiene secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos usando ratones comercialmente disponibles que han sido manipulados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. Los anticuerpos pueden ser quiméricos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que combina características de dos anticuerpos diferentes. Se conocen en la técnica métodos de preparación de anticuerpos quiméricos.

La secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo puede obtenerse y entonces clonarse en un vector para la expresión o propagación. Los anticuerpos pueden prepararse recombinantemente y expresarse usando métodos

conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, la glucoproteína sF puede usarse como un antígeno para los fines de aislar anticuerpos recombinantes por estas técnicas. Los anticuerpos pueden prepararse recombinantemente usando la secuencia de gen para expresar el anticuerpo recombinantemente en células hospedadoras. Se conocen en la técnica métodos de preparación de derivados de anticuerpos y anticuerpos recombinantes.

Los anticuerpos pueden unirse a un vehículo por métodos convencionales en la materia, para su uso en, por ejemplo, aislar o purificar las glucoproteínas F de Hendra o Nipah nativas o detectar las glucoproteínas F de Hendra o Nipah nativas en una muestra biológica o espécimen. Pueden administrarse anticuerpos neutralizantes como inmunoterapia pasiva a un sujeto infectado con o que se sospecha que está infectado con virus de Hendra o de Nipah.

Un anticuerpo es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en cinco de las unidades de heterotetrámero básicas junto con un polipéptido adicional llamado la cadena J, y por tanto contiene diez sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden dos a cinco de las unidades de cuatro cadenas básicas junto con la cadena J). La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes y los métodos de la presente invención incluyen el uso de anticuerpos con tanto una cadena L kappa como lambda. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Éstas son cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las clases gamma y alfa se dividen además en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los métodos de la presente invención incluyen el uso de anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales, de cualquiera de las clases y/o subclases anteriores.

Como se usa en el presente documento, el término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables se diferencian ampliamente en secuencia entre anticuerpos. El dominio variable media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través del espacio de 110 aminoácidos de los dominios variables. En su lugar, las regiones variables consisten en tramos relativamente invariantes llamados regiones estructurales (FR) de aproximadamente quince a treinta aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables" que tienen cada una aproximadamente nueve a doce aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones estructurales, que adoptan en gran medida una configuración de hoja beta, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por la región estructural y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de anticuerpos (véase Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service, National Institutes of Health). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" que contribuye a la especificidad del anticuerpo.

El término "anticuerpos o fragmentos de los mismos" puede referirse a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido sF o un fragmento de un polipéptido sF y no se unen específicamente a otros polipéptidos no sF. Los anticuerpos o fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido sF o fragmento del mismo pueden no reaccionar de forma cruzada específicamente con otros antígenos (por ejemplo, la unión no puede impedirse por competición con una proteína no sF, por ejemplo, BSA en un inmunoensayo apropiado). Los anticuerpos o fragmentos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido sF pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos u otras técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Los anticuerpos incluyen anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantemente producidos, intracuerpos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fvs monocatenarios (scFv) (incluyendo scfvs biespecíficos), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos con disulfuro (sdFv) y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno sF (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-sF).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores e incluye fragmentos de anticuerpos como se define en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse por la metodología de hibridomas descrita por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495, o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, de animal eucariota o vegetales (véase la patente de EE.UU. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 y Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 581-597.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión al antígeno, además de un C₁ y al menos dominios constantes de la cadena pesada, C_{H1} y C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la CDR de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fv, Fab' y F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. 5.641.870 y Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8, 1057-1062); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da un único fragmento grande F(ab')₂ que se corresponde aproximadamente con dos fragmentos unidos por disulfuro Fab que tienen actividad de unión al antígeno divalente y es todavía capaz de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de fragmentos Fab por tener algunos restos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-S_H es la designación en el presente documento para Fab' en el que el (el) resto(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones del extremo carboxi de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, región que también es la parte reconocida por los receptores de Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

Como se usa en el presente documento, "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión del antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (tres bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión entero.

Como se usa en el presente documento, "Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno (véase Rosenberg et al. (1994) *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, pp. 269-315).

Como se usa en el presente documento, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos preparados construyendo fragmentos de sFv (véase el párrafo precedente) con conectores cortos (aproximadamente 5 a aproximadamente 10 restos) entre los dominios V_H y V_L de forma que se logre el emparejamiento intercatenario, pero no intracatenario, de los dominios V, produciendo un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "híbridos" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los

diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento WO 93/11161 y Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros componentes proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará a más del 95 % en peso de anticuerpo, y lo más preferentemente más del 99 % en peso. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo conjugado pueden unirse a un epítipo en el dominio citoplásmico de una proteína específica para células cancerosas (es decir, un marcador de células cancerosas). Un anticuerpo conjugado puede incluir, pero no se limita a, un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio citoplásmico de sF.

Composiciones farmacéuticas que comprenden la glucoproteína sF

Otro aspecto de la invención se refiere a composición farmacéutica que contiene las glucoproteínas F solubles en la invención. También pueden usarse anticuerpos y ácidos nucleicos de la invención como parte de una composición farmacéutica. Las composiciones generalmente comprenden, a modo de ejemplo y no limitación, una cantidad eficaz de un ácido nucleico o polipéptido (por ejemplo, una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria) de la invención o anticuerpo de la invención (por ejemplo, una cantidad de un anticuerpo neutralizante suficiente para mitigar la infección, aliviar un síntoma de infección y/o prevenir la infección). Los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos pueden comprender además vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica (véase generalmente Remington, (2005) The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams and Wilkins).

Los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden estar en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Vehículos aceptables, excipientes o estabilizadores pueden ser no tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones que se administran. Vehículos, excipientes o estabilizadores puede comprender además tampones. Ejemplos de tampones incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono (tales como monosacárido y disacárido), azúcares (tales como sacarosa, manitol y sorbitol), fosfato, citrato, antioxidantes (tales como ácido ascórbico y metionina), conservantes (tales como fenol, butanol, benzanol; alquilparabenos, catecol, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas (tales como albúmina de suero o inmunoglobulinas), polímeros hidrófilos, aminoácidos, agentes quelantes (tales como EDTA), contraiones formadores de sales, complejos metálicos (tales como complejos de Zn-proteína) y tensioactivos no iónicos (tales como TWEEN™ y polietilenglicol).

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además agentes adicionales que sirven para potenciar y/o complementar el efecto deseado. A modo de ejemplo, para potenciar la inmunogenicidad de una glucoproteína F soluble de la invención que se administra como una vacuna de subunidad, la composición farmacéutica puede comprender además un adyuvante.

Vacunas para henipavirus

La divulgación también se refiere al uso de la glucoproteína sF como agente de vacunación. La formulación de una vacuna o composición inmunogénica empleará una cantidad eficaz de antígeno de polipéptido. Es decir, se incluirá una cantidad de antígeno que hará que el sujeto produzca una respuesta inmunológica específica y suficiente para conferir protección al sujeto de la posterior exposición al virus de Hendra o de Nipah. La glucoproteína sF de HeV o NiV, o una combinación de las mismas, puede administrarse por sí misma o en combinación con un adyuvante.

Los adyuvantes incluyen sales de aluminio (alumbre), adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), muramildipéptido (MDP), análogos sintéticos de MDP, N-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutamilo-L-alanina-2-[1,2-dipalmitoil-s-glicero-3-(hidroxifosforilo)]etilamida (MTP-PE) y composiciones que contienen un aceite metabolizable y un agente emulsionante, en el que el aceite y el agente emulsionante están presentes en forma de una emulsión de aceite en agua que tiene gotitas de aceite sustancialmente todas las cuales son inferiores a un micrómetro de diámetro (véase, por ejemplo, el documento EP 0399843).

El adyuvante puede comprender un ligando 4 de receptor de tipo Toll (TLR), en combinación con una saponina. El ligando 4 de receptor de tipo Toll (TLR) puede ser, por ejemplo, un agonista tal como un derivado de lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3 D-MPL). 3 D-MPL se comercializa con la marca registrada MPL® por Corixa Corporation y principalmente promueve respuestas de linfocitos T CD4+ con un fenotipo de IFN-g (Th1). Puede producirse según los métodos desvelados en el documento GB 2220211A. Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Las composiciones pueden usar 3 D-MPL de partícula pequeña. 3 D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de

partícula de forma que puede ser esterilizado por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en la solicitud de patente PCT WO 9421292.

El adyuvante también puede comprender uno o más derivados sintéticos de lípido A que son conocidos por ser agonistas de TLR 4 que incluyen, pero no se limitan a: OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), como se describe en la solicitud de patente PCT WO 95/14026; OM 294 DP (3S, 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol, 1,10-bis(dihidrogenofosfato), como se describe en los documentos WO 9964301 y WO 00/0462; y OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol, 1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127).

Otros ligandos de TLR4 incluyen, pero no se limitan a, fosfatos de alquilglucosaminida (AGP tales como los desvelados en el documento WO 98/50399 o la patente de EE.UU. 6.303.347 (también se desvelan procesos para la preparación de AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se desvelan en la patente de EE.UU. 6.764.840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Ambos pueden usarse como uno o más adyuvantes.

Una saponina preferida puede ser Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quillaja Saponaria Molina* y se describió por primera vez por tener actividad de adyuvante por Dalsgaard et al. (1974) Saponin adjuvants, Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, pp. 243-254. Fragmentos purificados de Quil A han sido aislados por HPLC que retienen la actividad de adyuvante sin la toxicidad asociada a Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina que induce linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

Se han descrito formulaciones particulares de QS21 que son particularmente preferidas, estas formulaciones comprenden además un esteroide (documento WO 96/33739). Las saponinas pueden estar separadas en forma de micelas, micelas mixtas (preferencialmente, pero no exclusivamente con sales biliares) o pueden estar en forma de matrices ISCOM (documento EP 0109942 B1), liposomas o estructuras coloidales relacionadas tales como complejos multiméricos similares de gusano o similares a anillo o estructuras lipídicas/en capas y láminas cuando se formulan con colesterol y lípido, o en forma de una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, como en el documento WO 95/17210). Las saponinas pueden asociarse a una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287). Una saponina puede presentarse en forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

Los adyuvantes pueden ser combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento EP 0671948 B1) y emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documentos WO 95/17210, WO 98/56414).

Se contempla el uso de la glucoproteína sF como una vacuna de subunidad. Una vacuna de subunidad se refiere al uso de un fragmento de un virus como un agente de inoculación. Aquellos expertos en la materia sabrán que las vacunas de subunidad ofrecen un medio de generación de anticuerpos para una parte o región particular de un virus. A modo de ejemplo, una forma recombinante de un receptor de superficie de un virus puede servir de una vacuna de subunidad. Una vacuna de subunidad que comprende glucoproteína F soluble de HeV o NiV, o combinaciones de los mismos, puede administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intrarterial, por vía intramuscular, por vía intracárdica, por vía intraespinal, por vía intratorácica, por vía intraperitoneal, por vía intraventricular, por vía sublingual y/o por vía transdérmica. El programa de dosificación de la administración y la eficacia de vacunas de subunidad pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica.

Método de uso de formas solubles de la glucoproteína F

Un aspecto de la presente invención se refiere a la detección de NiV y/o HeV. Aspectos de la divulgación se refieren al tratamiento y la prevención de NiV y/o HeV. Un animal puede recibir tratamiento y/o prevención y/o detección de NiV y/o HeV. El animal puede ser un ser humano. Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para producir anticuerpos para NiV y/o HeV *in vivo*. Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para determinar si un sujeto produce anticuerpos para NiV y/o HeV. El polipéptido puede usarse para aislar anticuerpos. Los polipéptidos pueden unirse a una matriz de afinidad.

Pueden usarse ácidos nucleicos para transformar y/transfectar células con polipéptidos y/o anticuerpos recombinantemente producidos. Pueden utilizarse además ácidos nucleicos para tratar un sujeto infectado. Pueden usarse ácidos nucleicos en la inhibición de la expresión génica. Pueden usarse ácidos nucleicos para determinar si un sujeto está infectado con NiV y/o HeV. Esto puede lograrse usando métodos de hibridación radiomarcada.

Pueden usarse anticuerpos para reconocer una infección por NiV y/o HeV. Los anticuerpos pueden reconocer la glucoproteína F nativa como un antígeno. También pueden usarse anticuerpos para combatir una infección por NiV

y/o HeV. Los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales pueden emplear una respuesta inmunitaria del propio sujeto a una infección por NiV y/o HeV. Los anticuerpos pueden acoplarse a una citocina o una toxina o una enzima o un marcador para ayudar en el tratamiento y la detección de una infección.

5 Un aspecto de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico. Se conocen en la técnica muchos tipos de ensayo. Aquellos expertos en la materia reconocerán la amplia matriz de usos basados en investigación para polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos. Los polipéptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos pueden, por ejemplo, ser marcados, tales como con moléculas radiactivas, quimioluminiscentes, fluorescentes y/o colorantes. Los anticuerpos, ácidos nucleicos y polipéptidos se prestan a sí mismos para uso en ensayos, por ejemplo, ensayos de ADN (tales como transferencia Southern), ensayos de ARN (tales como transferencia Northern), ensayos de proteína (tales como transferencia Western), ensayos cromatográficos (tales como gas, líquido, HPLC, exclusión por tamaño), inmunoensayos (tales como ELISA) y ensayos estructurales (tales como cristalografía y espectroscopía de RMN). Pueden usarse además anticuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos como sondas. Ensayos que amplifican las señales de una sonda son conocidos para aquellos expertos en la materia.

15 Kits de diagnóstico que comprenden formas solubles de la glucoproteína F

Otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de la glucoproteína sF como parte de un kit usado para detectar la presencia de virus de Hendra o de Nipah. Los kits pueden incluir uno o más receptores que comprenden, a modo de ejemplo, y no limitación, ácidos nucleicos que codifican una glucoproteína sF de HeV o NiV o combinaciones de las mismas, una glucoproteína sF de HeV o NiV o combinaciones de las mismas y/o anticuerpos, y pueden usarse instrucciones para el uso de las glucoproteínas sF y/o anticuerpos en una variedad de inmunoensayos para virus de Hendra y de Nipah. La glucoproteína sF recombinante puede servir para funcionar como un antígeno para los fines de detección de anticuerpo en muestras biológicas. Los receptores pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases multi-dosis) o dosis de subunidad. Los kits pueden estar en envase adecuado. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal o un dispositivo de infusión. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril. El recipiente puede también tener un puerto de acceso estéril. Los kits pueden opcionalmente proporcionar componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa.

30 Los siguientes ejemplos de trabajo señalan realizaciones ilustrativas de la invención, y no deben interpretarse como limitantes de ningún modo del resto de la divulgación.

Ejemplos

35 Todas las construcciones de sF descritas en los siguientes ejemplos se manipularon usando una versión modificada del vector de expresión comercialmente disponible pcDNA3.1 Hygro(+) (Invitrogen Corp.). El marcador de selección de higromicina permite la selección de células satisfactoriamente transfectadas en presencia del antibiótico de higromicina B. Se modificó pcDNA3.1 Hygro(+) incorporando la región promotora de citomegalovirus (CMV) potenciada de pHCMV 1 (Gelantis). Este promotor del CMV potenciado permite la alta expresión de las secuencias insertadas en el esqueleto del vector pcDNA3.1 Hygro(+). La adición de secuencia de ácidos nucleicos para codificar una secuencia de péptido S (SEQ ID NO: 5) facilitó la purificación de la glucoproteína sF liberada. Se introdujeron secuencias de ácidos nucleicos adicionales en algunas versiones que producirían codificar regiones de péptido adicionales, tales como un sitio de escisión de GPI-fosfolipasa D (SEQ ID NO: 7), un motivo GCN4 trimérico (SEQ ID NO: 9) y un sitio de escisión del factor Xa (SEQ ID NO: 11). Se generaron construcciones de plásmidos de expresión con estas secuencias de ácidos nucleicos y se usaron para generar líneas celulares estables que expresaban las diversas versiones de las proteínas. La secuencia de 13 aminoácidos de péptido S (Novagen) se añadió al extremo C en todas las construcciones. La expresión de péptido S facilita la purificación por S-proteína agarosa (Novagen), además de la inmunodetección por anticuerpos anti-péptido S.

50 Ejemplo 1: Producción del trímero de glucoproteína sF de HeV y detección por cromatografía de exclusión por tamaño

Materiales y métodos. Se transfectaron células 293T con el vector pcDNA3.1 Hygro(+) modificado que contenía una inserción para codificar los primeros 488 aminoácidos de la glucoproteína F de HeV, seguido de una secuencia de péptido S. La selección para la transfección se realizó usando higromicina B, y las células supervivientes se mantuvieron en presencia de higromicina usando protocolos de cultivo de tejido estándar. Se recogieron células y medios por protocolos convencionales. Las soluciones resultantes se resolvieron por cromatografía de exclusión por tamaño, usando una columna de filtración en gel Superdex™ 200 10/300, recogiendo fracciones de 400 µl.

60 Resultados. El perfil de elución por filtración en gel muestra un supuesto pico de trímero que eluye a ~ 299 kDa, una especie de peso molecular más alto con un pico de ~ 552 kDa y agregados más grandes que eluyen cerca del volumen vacío (Vo) (Figura 1).

Ejemplo 2: Producción de la glucoproteína sF de NiV por escisión por fosfolipasa D

Materiales y métodos. Como la secreción de sF de NiV nativa era pobre, se manipuló una versión modificada de sF de NiV, por lo que se unió una secuencia señal de anclaje de glucoilfosfatidilinositol (GPI) a la secuencia de nucleótidos de sF de NiV. Las células HeLa-PLD son una versión modificada de células HeLa que expresan establemente fosfolipasa D (PLD) (Mann (2004) Biochem. J. 378: 641-648). PLD escinde entonces específicamente el enlace de fosfo-glicerol en proteínas ancladas por GPI. Esto produce la liberación de proteínas unidas a GPI de la membrana de anclaje. Este mecanismo produce entonces la secreción de GPI de sF de NiV previamente anclado con GPI de las células HeLa-PLD.

Se transfectaron células HeLa-PLD con el vector pcDNA 3.1 Hygro (+) modificado que contiene una inserción para codificar los primeros 488 aminoácidos de la glucoproteína F de NiV, seguido de una secuencia de péptido S y entonces una secuencia de GPI para permitir la escisión de PLD. La selección para transfección se realizó usando higromicina B, y las células supervivientes se mantuvieron en presencia de higromicina usando protocolos de cultivo de tejido estándar. Se recogieron células y medios por protocolos convencionales. Las soluciones resultantes se resolvieron por cromatografía de exclusión por tamaño, usando una columna de filtración en gel Superdex™ 200 10/300, recogiendo fracciones de 400 µl. Se desnaturalizaron muestras de 5 µl de cada fracción y se resolvieron por BN-PAGE. El gel resultante se transfirió a una membrana, y tras el bloqueo estándar y los protocolos de lavado, se sondó con anticuerpos para la secuencia de péptido S que están conjugados con HRP para permitir la detección quimioluminiscente estándar.

Resultados. El perfil de elución de la filtración en gel de la construcción de sF de NiV-GPI muestra el supuesto pico de trímero que eluye a ~ 186 kDa, una especie de peso molecular más alto con un pico de ~ 357 kDa y agregados más grandes que eluyen cerca del volumen vacío (Vo) (Figura 2A).

Ejemplo 3: Estabilización de los trímeros de glucoproteínas sF de HeV y NiV por el motivo GCN4

Materiales y métodos. Se transfectaron células 293T con el vector pcDNA3.1 Hygro(+) modificado que contenía una inserción para codificar los primeros 488 aminoácidos de la glucoproteína F de NiV o HeV, seguido de una secuencia de GCN, luego una secuencia de escisión del factor Xa y luego una secuencia de péptido S. La selección para la transfección se realizó usando higromicina B, y las células supervivientes se mantuvieron en presencia de higromicina usando protocolos de cultivo de tejido estándar. Se recogieron células y medios por protocolos convencionales. Las soluciones resultantes se resolvieron por cromatografía de exclusión por tamaño, usando una columna de filtración en gel Superdex™ 200 10/300, recogiendo fracciones de 400 µl. Se desnaturalizaron muestras de 5 µl de cada fracción y se resolvieron por BN-PAGE. El gel resultante se transfirió a papel de nitrocelulosa, y tras los protocolos de bloqueo y lavado estándar, se sondó con anticuerpos para la secuencia de péptido S que están conjugados con HRP para permitir la detección quimioluminiscente estándar.

Resultados. La expresión y secreción de glucoproteínas sF de HeV y NiV que contenían un motivo GCN4 mejoró al menos 10 veces que la de sus células sF no mutantes respectivas. Esto indica que el motivo de GCN4 afecta la optimización de codones y la estabilización de sF.

También pueden observarse diferencias en los perfiles de elución entre sF no mutante y sF-GCN. Las especies oligoméricas más altas observadas en los perfiles de sF no mutante estuvieron ausentes en sF-GCN. Se observó una especie agregada alta y un único supuesto pico de trímero que eluyen a aproximadamente 327 y 306 kDa para sF de HeV y NiV-GCN, respectivamente (Figura 3A y Figura 4A). La especie agregada para sF de HeV-GCN era mucho menor en comparación con todas las otras sF. Esto sugiere que la estabilización de trímero por el motivo de GCN elimina formas oligoméricas más altas que están presentes en la no GCN-sF. El análisis de gel nativo usando el sistema de Blue Native (BN)-PAGE (Invitrogen) de todas las sF y las fracciones de toda las filtraciones en gel muestran tamaños correspondientes de las especies de trímero (Figuras 2-4B y Figura 5), excepto por sF de NiV-GPI, que tiene una masa molecular aparente más alta en gel nativo en comparación con el análisis de filtración en gel (Figura 4).

Ejemplo 4: Las glucoproteínas sF de HeV y NiV son inmunogénicas en ratones y pueden provocar respuestas de anticuerpos policlonales reactivos cruzados y neutralizantes

Materiales y métodos. Se usaron sF S de HeV marcada y sF-GCN, y sF S de NiV-GPI marcada y sF-GCN para inmunizar ratones Balb/C. Se extrajo sangre de cada ratón antes de la inmunización para obtener suero como control negativo. Cada ratón se sensibilizó y reforzó 3 veces con diferentes preparaciones de sF como se indica en la Tabla 1. Cada inmunización se realizó con 10 lag de proteína usando TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma) con intervalos de 28 días. Se extrajo sangre de los ratones 10 días después de la inmunización y se recogieron muestras de suero. Se reunieron el suero recogido del segundo y tercer refuerzo y se examinó por ELISA. Los sueros de ratón inmunizados con sF también se probaron para su capacidad para inmunoprecipitar F de HeV y NiV sin marcar de longitud completa. Los sueros de ratón inmunizados con sF también se probaron para una capacidad para neutralizar viriones indicadores de luciferasa retroviral pseudotipificados de NiV.

Se observó anticuerpo de reactividad cruzada específico de F de HeV y NiV en todos los ratones como se indica en el ensayo de ELISA (Figura 6A y 6B) y como se demuestra por el ensayo de inmunoprecipitación realizado con F de HeV y NiV de longitud completa (Figura 7). Fue evidente una respuesta de anticuerpos de título más bajo contra la cola de GCN cuando se usó una proteína no relacionada (glucoproteína de la envuelta del VIH-1-GCN) para recubrir la placa (Figura 5C). Los ratones que se inmunizaron con la no GCN-sF no mostraron reactividad contra la envuelta de VIH-1-GCN. También se generaron anticuerpos neutralizantes y neutralizantes de reactividad cruzada como se indica por la neutralización del gen luciferasa que codifica retrovirus pseudotipificado con el ensayo de entrada de F y G de NiV. El ensayo se llevó a cabo usando diluciones de suero (Tabla 2) de ratones inmunizados con las glucoproteínas sF-GCN para bloquear la entrada de virus vivo NiV y HeV (Figura 8). Esto también indica que los ratones inmunizados con estas preparaciones de sF pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales murinos específicos para F, algunos de los cuales se esperaría que reaccionaran de forma cruzada. Los resultados indican que las preparaciones de glucoproteína sF son inmunogénicas, provocarán anticuerpos que pueden reconocer las glucoproteínas F nativas de longitud completa, provocarán anticuerpos de reactividad cruzada y provocarán anticuerpos neutralizantes para virus de reactividad cruzada cuando se administren como una vacuna. Además, los datos indican que sF podría usarse como herramienta de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-HeV o anti-NiV de fuentes animales y humanas.

Tabla 1: Resumen de diferentes inmunizaciones de ratón con diversas preparaciones de proteína sF. Se sensibilizaron ratones Balb/C con el antígeno indicado y posteriormente se reforzaron 3 veces con un antígeno sF purificado por S-proteína diferente (en algunos casos se eliminó el péptido S marcado) con intervalos de 28 días. Se extrajo sangre de los ratones 10 días después de cada refuerzo-inmunización. Se recogieron los sueros y se reunieron.

Ratón N.º	Inmunizaciones		Reactividad cruzada
	Antígeno sensibilizado 1 ×	Refuerzo de antígeno 3 ×	
3 y 4	sF S de HeV marcada	sF S de HeV marcada	Sí
5 y 6	sF S de HeV marcada	sF de HeV-GCN no marcada	Sí
7 y 8	sF S de NiV-GPI marcada	sF de NiV-GCN no marcada	Sí

Tabla 2: Neutralización de suero de NiV y HeV. Se diluyeron sucesivamente suero de ratón inmunizado con las proteínas indicadas en una placa de 96 pocillos en EMEM y se mezclaron con 200 TCID₅₀ de tanto HeV como NiV durante 30 min a 37 °C. Se añadieron 2 × 10⁶ células Vero a cada pocillo, se incubaron durante 3 días a 37 °C y se observaron para signos de efecto citopático viral (CPE). El título del suero se determinó como la mayor dilución en la que el CPE viral se neutralizó completamente.

Ratón N.º	Inmunizado con	Título de neutralización (dilución de suero)	
		HeV	NiV
5	sF de HeV-GCN	1:10	1:10
6	sF de HeV	1:40	1:20
7	sF de NiV-GCN	1:5	1:160
8	sF de NiV-GPI	<1:5	1:40
control	SARS CoV	<1:5	<1:5

Ejemplo 5: Experimentos de equilibrio de sedimentación

Materiales y métodos. Se realizaron mediciones de ultracentrifugación analítica en una ultracentrifuga analítica Beckman XL-A Optima con un rotor An-60 Ti a 4 °C. Se dializaron muestras de proteína durante la noche en PBS con tampón al 0,01 % de Triton X-100, se cargaron a concentraciones iniciales de 0,75, 1,5 y 3 mg/ml y se analizaron a velocidades del rotor de 6.000 y 7.500 rpm. Los datos se adquirieron a dos longitudes de onda por velocidad de rotor y se ajustaron usando el programa NONLIN a un modelo de especie única del logaritmo natural de la absorbancia frente a la distancia radial al cuadrado (Johnson et al. (1981) Biophys. J. 36(3): 575-88). Se calcularon la densidad de disolvente y los parámetros de volumen específico parcial de proteína teniendo en cuenta el disolvente y la composición de proteína, respectivamente (Laue et. al. (1992) Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido).

Resultados. Se llevaron a cabo mediciones de equilibrio de sedimentación para determinar el estado oligomérico de sF de HeV-GCN purificado. La proteína es trimérica, con una masa molecular aparente de ~215 kDa (Figura 9). No hubo dependencia sistemática de la masa molecular aparente sobre la concentración de proteína durante un intervalo de concentración de 4 veces de proteína estudiada.

ES 2 626 634 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Broder, Christopher C Chan, Yee-Peng

5 <120> Formas solubles de la glucoproteína F del virus de Hendra y Nipah y usos de la misma

<130> 044508-5020-WO

10 <150> US 61/006.107
<151> 19-12-2007

<160> 12

15 <170> Patent In versión 3.4

<210> 1
<211> 1464
<212> ADN
<213> Virus de Hendra

20 <400> 1

```

atggctacac aagaggtcag gctaaagtgt ttgctctgtg ggatcatagt tctggttttg      60
tcattagaag ggctagggat actacattat gagaaactta gtaagatagg gctggttaaa      120
ggtattacaa gaaagtacaa gattaagagt aaccctttga ccaaggatat tgtgatcaaa      180
atgatcccta atgtctcgaa tgtctcaaag tgcaccggga ctgttatgga gaattacaaa      240
agcagactca cagggattct ctcaccaatc aaaggcgcca tcgaactgta caataataac      300
acgcatgacc tagttgggtga tgtcaagctt gcaggtgtgg tgatggcagg gattgcaatc      360
gggatagcta ctgctgcaca aatcacagca ggtgttgctt tatatgagggc aatgaagaac      420
gcagacaata tcaataaact caagagcagc atagagtcta caaatgagggc tgttgtcaaa      480
ttacaggaaa cagctgagaa aacagtctac gtccttactg ctcttcaaga ttacatcaac      540
actaaccttg ttctacaat agatcaaatt agctgcaagc aaacagagct cgcattagac      600
ttggcgttgt ctaagtatct gtctgatctg ctctttgttt tcggacctaa cttacaggat      660
ccagtctcta attccatgac tatccaagca atatctcaag catttggggg caattacgaa      720
accttactga gaacgcttgg ttacgcgacc gaggacttcg acggcctttt agaaagtgat      780
agcataacag gccagatagt ctatgtagat ctcagtagct attacataat agtaaggggtg      840
tattttecca tactaacaga gatccaacag gcttatgtgc aggagttgct tccagtgagt      900
ttaataacg ataattcaga atggatcagc attgtcccga atttcgtgct gattaggaac      960
acgctgattt caaatataga agtcaagtac tgcttaatca ccaagaaaag tgtgatttgt     1020
aatcaggact atgctacacc catgacggct agcgtgagag aatgcttgac aggatccaca     1080
gataagtgcc caagggagtt agtagtctca tcccatgttc caagatttgc cctctcagga     1140

```

ES 2 626 634 T3

ggagtcttgt ttgcaaattg tataagtgtg acatgtcagt gtcagactac tgggagggca 1200
atatctcaat caggggaaca gacactactg atgattgaca atactacctg cacaacagtt 1260
gttctaggaa acataatcat aagccttggg aaatatttgg gatcaataaa ttacaattct 1320
gagagcattg ctgttgggcc accagtctat acagacaaag ttgatatctc aagtcagata 1380
tctagtatga atcaatcact acaacaatct aaggattaca ttaaagaagc tcaaaagatc 1440
ttggacactg tgaatccgtc gttg 1464

5 <210> 2
<211> 488
<212> PRT
<213> Virus de Hendra

10 <400> 2

ES 2 626 634 T3

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

Val Leu Val Leu Ser Leu Glu Gly Leu Gly Ile Leu His Tyr Glu Lys
 20 25 30

Leu Ser Lys Ile Gly Leu Val Lys Gly Ile Thr Arg Lys Tyr Lys Ile
 35 40 45

Lys Ser Asn Pro Leu Thr Lys Asp Ile Val Ile Lys Met Ile Pro Asn
 50 55 60

Val Ser Asn Val Ser Lys Cys Thr Gly Thr Val Met Glu Asn Tyr Lys
 65 70 75 80

Ser Arg Leu Thr Gly Ile Leu Ser Pro Ile Lys Gly Ala Ile Glu Leu
 85 90 95

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

Val Val Met Ala Gly Ile Ala Ile Gly Ile Ala Thr Ala Ala Gln Ile
 115 120 125

Thr Ala Gly Val Ala Leu Tyr Glu Ala Met Lys Asn Ala Asp Asn Ile
 130 135 140

Asn Lys Leu Lys Ser Ser Ile Glu Ser Thr Asn Glu Ala Val Val Lys
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Val Tyr Val Leu Thr Ala Leu Gln

ES 2 626 634 T3

Cys Thr Thr Val Val Leu Gly Asn Ile Ile Ile Ser Leu Gly Lys Tyr
420 425 430

Leu Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Ser Glu Ser Ile Ala Val Gly Pro Pro
435 440 445

Val Tyr Thr Asp Lys Val Asp Ile Ser Ser Gln Ile Ser Ser Met Asn
450 455 460

Gln Ser Leu Gln Gln Ser Lys Asp Tyr Ile Lys Glu Ala Gln Lys Ile
465 470 475 480

Leu Asp Thr Val Asn Pro Ser Leu
485

<210> 3
<211> 1464
<212> ADN
<213> Virus de Nipah

5

<400> 3

ES 2 626 634 T3

atggtagtta tacttgacaa gagatggtat tgtaatcttt taatattgat tttgatgatc 60
 tccgagtgta gtggtgggat tctacattat gagaaattga gtaaaattgg acttgtcaaa 120
 ggagtaacaa gaaaatacaa gattaaaagc aatcctctca caaaagacat tgttataaaa 180
 atgattccga atgtgtcggga catgtctcag tgcacagggga gtgtcatgga aaattataaa 240
 acacgattaa acggtatctt aacacctata aagggagcgt tagagatcta caaaaacaac 300
 actcatgacc ttgtcgggta tgtgagatta gccggagtta taatggcagg agttgctatt 360
 gggattgcaa ccgcagctca aatcactgca ggcgtagcac tatatgaggc aatgaagaat 420
 gctgacaaca tcaacaaact caaaagcagc attgaatcaa ctaatgaagc tgtcgttaaa 480
 cttcaagaga ctgcagaaaa gacagtctat gtgctgactg ctctacagga ttacattaat 540
 actaatttag taccgacaat tgacaagata agctgcaaac agacagaact ctactagat 600
 ctggcattat caaagtacct ctctgatttg ctttttgtat ttggcccaa ccttcaagac 660
 ccagtttcta attcaatgac tatacaggct atatctcagg cattcgggtgg aaattatgaa 720
 aactgctaa gaacattggg ttacgctaca gaagactttg atgatcttct agaaagtgac 780
 agcataacag gtcaaactcat ctatggtgat ctaagtagct actatataat tgtcagggtt 840
 tattttccta ttctgactga aattcaacag gcctatatcc aagagttggt accagtgagc 900
 ttcaacaatg atgattcaga atggatcagt attgtcccaa atttcatatt ggtaaggaat 960
 acattaatat caaatataga gattggattt tgcctaatta caaagaggag cgtgatctgc 1020

 aaccaagatt atgccacacc tatgaccaac aacatgagag aatgtttaac gggatcgact 1080
 gagaagtgtc ctcgagagct ggttgtttca tcacatgttc ccagatttgc actatctaac 1140
 ggggttctgt ttgccaaattg cataagtgtt acatgtcagt gtcaaacaac aggcagggca 1200
 atctcacaat caggagaaca aactctgctg atgattgaca acaccacctg tcctacagcc 1260
 gtactcggta atgtgattat cagcttaggg aaatatctgg ggtcagtaaa ttataattct 1320
 gaaggcattg ctatcgggtcc tccagctctt acagataaag ttgatataac aagtcagata 1380
 tccagcatga atcagtcctt acaacagtct aaggactata tcaaagaggc tcaacgactc 1440
 cttgatactg ttaatccatc atta 1464

<210> 4
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Virus de Nipah

5

ES 2 626 634 T3

<400> 4

Met Val Val Ile Leu Asp Lys Arg Cys Tyr Cys Asn Leu Leu Ile Leu
 1 5 10 15

Ile Leu Met Ile Ser Glu Cys Ser Val Gly Ile Leu His Tyr Glu Lys
 20 25 30

Leu Ser Lys Ile Gly Leu Val Lys Gly Val Thr Arg Lys Tyr Lys Ile
 35 40 45

Lys Ser Asn Pro Leu Thr Lys Asp Ile Val Ile Lys Met Ile Pro Asn
 50 55 60

Val Ser Asp Met Ser Gln Cys Thr Gly Ser Val Met Glu Asn Tyr Lys
 65 70 75 80

Thr Arg Leu Asn Gly Ile Leu Thr Pro Ile Lys Gly Ala Leu Glu Ile
 85 90 95

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

Val Ile Met Ala Gly Val Ala Ile Gly Ile Ala Thr Ala Ala Gln Ile
 115 120 125

Thr Ala Gly Val Ala Leu Tyr Glu Ala Met Lys Asn Ala Asp Asn Ile
 130 135 140

ES 2 626 634 T3

Asn Lys Leu Lys Ser Ser Ile Glu Ser Thr Asn Glu Ala Val Val Lys
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Thr Ala Glu Lys Thr Val Tyr Val Leu Thr Ala Leu Gln
 165 170 175

Asp Tyr Ile Asn Thr Asn Leu Val Pro Thr Ile Asp Lys Ile Ser Cys
 180 185 190

Lys Gln Thr Glu Leu Ser Leu Asp Leu Ala Leu Ser Lys Tyr Leu Ser
 195 200 205

Asp Leu Leu Phe Val Phe Gly Pro Asn Leu Gln Asp Pro Val Ser Asn
 210 215 220

Ser Met Thr Ile Gln Ala Ile Ser Gln Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Glu
 225 230 235 240

Thr Leu Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ala Thr Glu Asp Phe Asp Asp Leu
 245 250 255

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

Ser Tyr Tyr Ile Ile Val Arg Val Tyr Phe Pro Ile Leu Thr Glu Ile
 275 280 285

Gln Gln Ala Tyr Ile Gln Glu Leu Leu Pro Val Ser Phe Asn Asn Asp
 290 295 300

Asp Ser Glu Trp Ile Ser Ile Val Pro Asn Phe Ile Leu Val Arg Asn
 305 310 315 320

Thr Leu Ile Ser Asn Ile Glu Ile Gly Phe Cys Leu Ile Thr Lys Arg
 325 330 335

Ser Val Ile Cys Asn Gln Asp Tyr Ala Thr Pro Met Thr Asn Asn Met
 340 345 350

Arg Glu Cys Leu Thr Gly Ser Thr Glu Lys Cys Pro Arg Glu Leu Val
 355 360 365

Val Ser Ser His Val Pro Arg Phe Ala Leu Ser Asn Gly Val Leu Phe
 370 375 380

Ala Asn Cys Ile Ser Val Thr Cys Gln Cys Gln Thr Thr Gly Arg Ala

ES 2 626 634 T3

<400> 7

atcgatccaa ataaaggaag tggaaccact tcaggtacta cccgtcttct atctgggcac 60
 acgtgtttca cgttgacagg tttgcttggg acgctagtaa ccatgggctt gctgact 117

5 <210> 8
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos para GPI

<400> 8

Ile Asp Pro Asn Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Arg Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr Gly Leu Leu Gly Thr Leu
 20 25 30
 Val Thr Met Gly Leu Leu Thr
 35

15 <210> 9
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos para GCN4

25 <400> 9

atgaagcaga tcgaggacaa gatcgaggag atcctgagca agatctacca catcgagaac 60
 gagatcgcca ggatcaagaa gctgatcggc gag 93

30 <210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos para GCN4

<400> 10

ES 2 626 634 T3

Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
1 5 10 15

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
20 25 30

5 <210> 11
<211> 12
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos para Factor Xa

<400> 11
atcgagggca gg 12

15 <210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos para Factor Xa

<400> 12

Ile Glu Gly Arg
1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que comprende una forma antigénica soluble de una glucoproteína F del virus de Hendra, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 1 a 488 de SEQ ID NO: 2, o una forma antigénica soluble de una glucoproteína F del virus de Nipah, en el que el polipéptido comprende los aminoácidos 1 a 488 de SEQ ID NO: 4.
2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido está fusionado con un segundo polipéptido.
- 10 3. El polipéptido aislado de la reivindicación 2, en el que el segundo polipéptido comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: un epítipo de péptido S, un sitio de escisión del factor Xa y un dominio de trimerización.
- 15 4. El polipéptido aislado de la reivindicación 3, donde el dominio de trimerización es SEQ ID NO: 10.
5. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un kit de diagnóstico para detectar una infección por henipavirus en un sujeto que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el anticuerpo de la reivindicación 7.
- 30 10. Un método de detección de un henipavirus en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con i) el anticuerpo de la reivindicación 7 y detectar la unión del anticuerpo, en el que la unión del anticuerpo es indicativa de la presencia de henipavirus en la muestra biológica, o ii) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y detectar la unión del polipéptido, en el que la unión del polipéptido es indicativa de la presencia de henipavirus en la muestra biológica.
- 35 11. Un polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un medicamento.
12. Un polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la prevención de la infección por un henipavirus.
- 40 13. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un medicamento.
- 45 14. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento o la prevención de infección por un henipavirus.

















