

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 965**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2011 PCT/US2011/059602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061815**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11838942 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2635257**

54 Título: **Partículas tipo virus de la glicoproteína de la rabia (VLPs)**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410767 P

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

10.10.2017

73 Titular/es:

**NOVAVAX, INC. (100.0%)
9920 Belward Campus Drive
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, GALE y
LIU, YE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 636 965 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

Partículas tipo virus de la glicoproteína de la rabia (VLPs)

Descripción del archivo de texto presentado electrónicamente

5 Los contenidos del archivo de texto presentado electrónicamente adjunto forma parte de la presente solicitud. Copia en formato legible por ordenador del Listado de Secuencias (nombre de archivo: NOV_047_01WO_SeqList_ST25.txt, fecha registrada: 7 de noviembre de 2011, tamaño del archivo 7 kilobytes).

Campo técnico

La presente invención se refiere generalmente a métodos para preparar micelas que comprenden glicoproteínas (proteínas G) del virus de la rabia.

10 Antecedentes de la invención

El virus de la rabia (RV) es un virus de ARN de hebra negativa no segmentado de la familia Rhabdoviridae e induce una enfermedad neurológica fatal en humanos y animales. Más de 70,000 muertes humanas se reportan anualmente y millones de otras requieren tratamiento post exposición. Aunque se han realizado avances significativos en la prevención y el control de la rabia, la enfermedad sigue siendo una amenaza importante para la salud pública y sigue causando numerosas muertes humanas en todo el mundo. Los caninos siguen siendo el reservorio más importante de Asia, África y América Latina donde ocurren la mayoría de los casos de rabia humana. En los países desarrollados, la rabia humana ha disminuido significativamente durante los últimos 50 años, principalmente como resultado de la vacunación de rutina de animales de compañía. Sin embargo, la transmisión de la rabia a través de la exposición a la vida silvestre ha surgido como una de las principales causas de la enfermedad. En los Estados Unidos, más del 90% de los casos de rabia animal han sido reportados en vida silvestre, representando amenazas continuas a la salud pública. La mayoría de los casos humanos en la última década se han asociado con RV encontrados en murciélagos, en particular los murciélagos de pelo plateado.

25 Los rhabdovirus tienen dos componentes estructurales principales: un núcleo helicoidal de ribonucleoproteína (RNP) y un envoltorio circundante. El genoma de la rabia codifica cinco proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), glicoproteína (G) y polimerasa (proteína grande) (L). El orden de los genes en el genoma de la rabia de tipo salvaje es 3'-N-P-M-G-L-5'. Las proteínas N, L y P están asociadas con el complejo de núcleo RNP. El complejo RNP consiste en el genoma del ARN encapsidado por la N en combinación con la polimerasa L y la proteína P. Este complejo sirve como una plantilla para la transcripción y replicación del virus. El componente de envoltorio viral del RV está compuesto por una glicoproteína (G) transmembrana y una proteína matriz (M). Las glicoproteínas forman aproximadamente 400 puntas triméricas que están dispuestas firmemente sobre la superficie del virus. La proteína M está asociada tanto con el envoltorio como con la RNP y puede ser la proteína central del ensamblaje de rhabdovirus.

35 Como se señaló anteriormente, la rabia sigue siendo una importante amenaza para la salud pública en todo el mundo. El control de la rabia y la protección de los seres humanos contra la rabia requieren varias estrategias de control, como la inmunización de rutina de los animales de compañía y los portadores de vida silvestre, la inmunización pre exposición de las personas en riesgo y el tratamiento post exposición de las personas mordidas por los animales rabiosos. Aunque las vacunas del virus de la rabia (RV) inactivadas preparadas a partir del cultivo celular son seguras y bien toleradas, tienen múltiples desventajas. Son difíciles de fabricar, difíciles de almacenar, tienen baja inmunogenicidad, y requieren inyecciones múltiples. Además, son costosas y por lo tanto están fuera del alcance de la mayoría de las personas que necesitan las vacunas en los países en desarrollo. Además, estas vacunas inactivadas típicamente incluyen adyuvantes que pueden causar efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, se necesitan vacunas del RV más seguras, más baratas y más eficaces.

La presente solicitud satisface esta necesidad mediante el desarrollo de un novedoso método para la producción de partículas tipo virus (VLP) que comprenden la glicoproteína (G) de la rabia.

45 Morein et al (Vaccine, Vol. 3, Junio 1985, páginas 83-93) y Berezin et al (Vaccine, Vol. 6, Octubre 1988, pág. 450-456) describen la producción de varias formas supramoleculares de glicoproteínas virales a partir de una suspensión viral purificada.

Fekadu et al (Vaccine Vol. 10, Publicación 3, 1992, pág. 192-197) describe la producción de una vacuna de la rabia de la subunidad estimulante del complejo inmune (ISCOM).

50 Perrin et al (Vaccine, Vol. 3, Septiembre 1985, páginas 325-332) describe la proteína de los inmunosomas de la rabia, que comprende glicoproteínas ancladas sobre liposomas preformados.

El documento EP0237686 describe secuencias de ADN derivadas del genoma del virus de la rabia.

Resumen de la invención

La presente solicitud describe partículas tipo virus (VLPs) del virus de la rabia (RV) para su uso en vacunas para el tratamiento y la prevención de la infección por la rabia. Las VLPs del RV descritas aquí tienen el potencial de inducir potentes respuestas inmunes en sujetos mamíferos contra el virus de la rabia.

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar micelas que comprenden glicoproteínas (proteínas G) del virus de la rabia (RV), en las que las proteínas G forman un trímero, que comprende:

(a) transformar una célula huésped de insecto Sf9 con un vector de baculovirus que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína G del RV;

(b) cultivar dicha célula huésped para expresar el ácido nucleico; y

(c) purificar la proteína G del RV en la forma de micelas.

10 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una vacuna o composición antigénica, que comprende hacer micelas que comprenden glicoproteínas del virus de la rabia mediante el método descrito anteriormente, y que comprende además una etapa de formular las micelas como vacuna o composición antigénica añadiendo una dosis efectiva de las micelas a la composición.

15 La presente solicitud describe VLPs del RV que comprenden una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. Las proteínas G del RV pueden derivarse de cualquier cepa del RV adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a, cepas del RV humanas, caninas, de murciélago, de mapache, de mofeta y de zorro. Las VLPs del RV que comprenden una o más proteínas G del RV que producen de acuerdo con la invención están en forma de micelas. En algunas realizaciones, las VLPs del RV pueden comprender una o más proteínas del RV adicionales, seleccionadas de la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M) y polimerasa (proteína grande) (L). En una realización específica, las VLPs del RV producidas por la presente invención pueden comprender la proteína matriz (M) del RV. En una realización, la proteína M se deriva de una cepa humana del RV. En otra realización, la proteína M se deriva de una cepa canina del RV. En otra realización más, la proteína M se deriva de una cepa de murciélago del RV. En otras realizaciones, la proteína matriz puede ser una proteína M1 de una cepa de virus de la gripe. En una realización, la cepa del virus de la gripe es una cepa del virus de la gripe aviar. En otras realizaciones, la proteína M puede derivarse de una cepa del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

25 En una realización, la secuencia codificante de la proteína G del RV se optimiza adicionalmente para mejorar su expresión en una célula huésped adecuada. En los métodos de la presente invención, la célula huésped es una célula de insecto Sf9.

30 Las VLPs del RV obtenidas por la presente invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el RV. Por lo tanto, también se describe aquí un método para provocar una respuesta inmune contra el RV. El método implica la administración a un sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que contiene una VLP del RV, tal como un sujeto humano o animal.

La solicitud también describe composiciones de vacuna farmacéuticamente aceptables que comprenden una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

35 La solicitud describe también una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. La solicitud también describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos de uno o más de los ingredientes de las formulaciones de vacuna de la invención.

40 Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona un método para formular una vacuna o composición antigénica que induce inmunidad a una infección o al menos un síntoma de enfermedad de la misma a un mamífero, que comprende añadir a la formulación una dosis eficaz de un VLP del RV que comprende uno o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. En una realización preferida, la infección es una infección por el RV.

45 Las VLPs del RV obtenidas en este documento son útiles para preparar composiciones que estimulan una respuesta inmune que confiere inmunidad o inmunidad sustancial contra agentes infecciosos. Por lo tanto, la solicitud describe un método para inducir inmunidad a infecciones o al menos un síntoma de enfermedad de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

50 La solicitud describe además un método para inducir una inmunidad sustancial a la infección por el RV o por lo menos un síntoma de la enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

Las composiciones aquí descritas pueden inducir una inmunidad sustancial en un vertebrado (por ejemplo, un humano o un canino) cuando se administra al vertebrado. Por lo tanto, la solicitud describe un método para inducir una inmunidad sustancial a la infección por el RV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas

5 (proteínas G) del RV. La solicitud describe también un método de vacunación de un mamífero contra el RV, que comprende administrar al mamífero una cantidad que induce protección de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. La formulación de la vacuna profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y jeringa, o un dispositivo de inyección sin aguja. En una realización ejemplar, la formulación de la vacuna se administra intramuscularmente.

La solicitud describe también un método para inducir una respuesta protectora de anticuerpo a una infección o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

10 La solicitud describe también un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por el RV o por lo menos un síntoma de la enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

La solicitud también describe un ácido nucleico aislado que codifica una glicoproteína (proteína G) de la rabia. En una realización ejemplar, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína de la glicoproteína (proteína G) de la rabia es la SEQ ID NO: 1.

15 La solicitud también describe una célula aislada que comprende un ácido nucleico que codifica una glicoproteína (proteína G) de la rabia. En una realización ejemplar, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína de las glicoproteínas (proteína G) de la rabia es la SEQ ID NO: 1.

20 La solicitud también describe un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una glicoproteína (proteína G) de la rabia. En una realización ejemplar, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína de la glicoproteína (proteína G) de la rabia es la SEQ ID NO: 1. En una realización, el vector es un vector de baculovirus.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa el mapa de plásmidos para el vector pFastBacl que comprende la secuencia de ácido nucleico G del virus de la rabia (SEQ ID NO: 1).

25 La Figura 2 representa los resultados del método de Western blot para proteínas G del RV usando sueros de conejo anti RV tanto bajo condiciones reductoras (Figura 2A) como no reductoras (Figura 2B).

La Figura 3 representa imágenes de partículas recombinantes purificadas de proteína G del RV en las formas de micelas tomadas usando microscopía electrónica de tinción negativa a un aumento de 150.000X.

La Figura 4 representa los resultados de ensayos de inducción de anticuerpos en conejos a los que se administran diluciones crecientes de partículas G del RV.

30 La Figura 5 muestra la secuencia de proteínas para el vector pFastBacl que comprende la secuencia de ácido nucleico G del virus de la rabia (SEQ ID NO: 1) (arriba) y la secuencia de la proteína G del RV (SEQ ID NO: 2) (abajo).

35 La Figura 6 es un gráfico que muestra los títulos de anticuerpos anti virus de la rabia en diferentes días, representados como la media geométrica para cada régimen de inmunización (n=5 para cada grupo de inmunización).

Descripción detallada

Definiciones

40 Tal como se utiliza aquí, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se usa en combinación con un inmunógeno específico (por ejemplo, una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV) en una formulación, aumentará o de otro modo alterará o modificará la respuesta inmune resultante. La modificación de la respuesta inmune incluye la intensificación o ampliación de la especificidad de cualquiera o ambos anticuerpos y respuestas inmunes celulares. La modificación de la respuesta inmune puede significar también disminuir o suprimir ciertas respuestas inmunes específicas del antígeno.

45 Como se usa aquí, el término "formulación antigénica" o "composición antigénica" se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, especialmente a un pájaro o a un mamífero, inducirá una respuesta inmune.

50 Tal como se utiliza aquí, el término "virus de la gripe aviar" se refiere a virus de gripe encontrados principalmente en aves, pero que también pueden infectar a seres humanos u otros animales. En algunos casos, los virus de la influenza aviar pueden transmitirse o propagarse de un ser humano a otro. Un virus de la gripe aviar que infecta a seres humanos tiene el potencial de causar una pandemia de gripe, es decir, morbilidad y/o mortalidad en los seres humanos. Una pandemia ocurre cuando surge una nueva cepa del virus de la gripe (un virus en el cual el ser humano no tiene inmunidad natural), que se extiende más allá de las localidades individuales, posiblemente alrededor del globo, e infecta a muchos humanos a la vez.

Tal como se utiliza aquí, una "dosis eficaz" se refiere generalmente a esa cantidad de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV suficientes para inducir inmunidad, para prevenir y/o mejorar una infección o para reducir al menos un síntoma de una infección o enfermedad, y/o para aumentar la eficacia de otra dosis de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. Una dosis eficaz puede referirse a la cantidad de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV suficientes para retrasar o minimizar el inicio de una infección o enfermedad. Una dosis eficaz también puede referirse a la cantidad de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV que proporcionan un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una infección o enfermedad. Además, una dosis eficaz es la cantidad con respecto a una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV solas, o en combinación con otras terapias, que proporcionan un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una infección o enfermedad. Una dosis efectiva también puede ser la cantidad suficiente para mejorar la propia respuesta inmune de un sujeto (por ejemplo, un humano) contra una exposición posterior a un agente o enfermedad infecciosa. Los niveles de inmunidad pueden monitorizarse, por ejemplo, midiendo cantidades de anticuerpos secretores neutralizantes y/o anticuerpos en suero, por ejemplo, mediante neutralización de placa, fijación del complemento, inmunoabsorbente ligado a enzima y análisis de microneutralización, o midiendo respuestas celulares tales como, pero sin limitarse a células T citotóxicas, células que presentan antígenos, células T auxiliares, células dendríticas y/u otras respuestas celulares. Las respuestas de células T pueden monitorizarse, por ejemplo, midiendo, por ejemplo, la cantidad de células CD4⁺ y CD8⁺ presentes usando marcadores específicos mediante citometría de flujo fluorescente o ensayos de células T, tales como, pero sin limitarse a, ensayo de proliferación de células T, ensayo citotóxico de células T, ensayo TETRAMER, y/o ensayo ELISPOT. En el caso de una vacuna, una "dosis afectiva" es aquella que previene la enfermedad y/o reduce la gravedad de los síntomas.

Tal como se usa aquí, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV necesarias o suficientes para lograr un efecto biológico deseado. Una cantidad eficaz de la composición sería la cantidad que logra un resultado seleccionado, y dicha cantidad podría determinarse como una cuestión de experimentación rutinaria por una persona experimentada en la técnica. Por ejemplo, una cantidad eficaz para prevenir, tratar y/o mejorar una infección podría ser la cantidad necesaria para causar la activación del sistema inmune, dando como resultado el desarrollo de una respuesta inmune específica del antígeno tras la exposición a una VLP del RV que comprende uno o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. El término es también sinónimo de "cantidad suficiente". En otra realización, la cantidad eficaz es la cantidad en peso de una micela G del RV que induce seroprotección en un modelo relevante animal, paciente animal o humano en un número de días deseado, por ejemplo, 7, 10, 14 o más días.

Tal como se utiliza aquí, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual los ácidos polinucleicos se transcriben en ARNm y se traducen en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido polinucleico se deriva del ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula o un organismo huésped eucariota apropiado, incluir el empalme del ARNm. En el contexto de la presente invención, el término también abarca el rendimiento de las ARNm del gen G del RV y las proteínas G del RV obtenidas tras la expresión de las mismas.

Tal como se utiliza aquí, el término "proteína G" o "glicoproteína G" o "polipéptido de proteína G" se refiere a un polipéptido o proteína que tiene toda o parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de proteína G del RV.

Como se usa aquí, los términos "inmunógenos" o "antígenos" se refieren a sustancias tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos que son capaces de provocar una respuesta inmune. Ambos términos también abarcan epítopos, y se usan indistintamente.

Como se usa aquí, el término "estimulador inmune" se refiere a un compuesto que potencia una respuesta inmune a través de los propios mensajeros químicos del cuerpo (citocinas). Estas moléculas comprenden diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interferones (IFN- γ), interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de la colonia de granulocitos macrófagos (GM) (CSF)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas estimuladoras inmunes pueden administrarse en la misma formulación que las VLPs de la invención o pueden administrarse por separado. Se puede administrar la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína para producir un efecto inmunoestimulante.

Como se usa aquí, el término "formulación inmunogénica" se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, induce una respuesta inmune.

Como se usa aquí, el término "agente infeccioso" se refiere a microorganismos que causan una infección en un vertebrado. Por lo general, los organismos son virus, bacterias, parásitos, protozoos y/u hongos.

Como se usa aquí, el término "multivalente" se refiere a composiciones que tienen una o más proteínas/péptidos antigénicos o inmunógenos contra múltiples tipos o cepas de agentes o enfermedades infecciosas, por ejemplo, más de un tipo de proteína G del RV, cepa, secuencia, etc.

Como se usa aquí, el término "vacuna farmacéuticamente aceptable" se refiere a una formulación que contiene una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV, que está en una forma que es capaz de administrarse a un vertebrado y que induce una respuesta inmune protectora suficiente para inducir inmunidad para prevenir y/o mejorar una infección o enfermedad y/o para reducir al menos un síntoma de una infección o enfermedad y/o para aumentar la eficacia de otra dosis de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. Típicamente, la vacuna comprende un medio de solución acuosa salino convencional o regulado en el que la composición de la presente invención está suspendida o disuelta. En esta forma, la composición de la presente invención se puede usar convenientemente para prevenir, mejorar o de otro modo tratar una infección. Al introducirla en un huésped, la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmune que incluye, pero no se limita a, la producción de anticuerpos y/o citocinas y/o la activación de células T citotóxicas, células presentadoras de antígeno, células T auxiliares, células dendríticas y/u otras respuestas celulares.

Como se usa aquí, la frase "respuesta inmune protectora" o "respuesta protectora" se refiere a una respuesta inmune mediada por anticuerpos contra un agente infeccioso o enfermedad, que es exhibida por un vertebrado (por ejemplo, un humano), que previene o mejora una infección o reduce al menos un síntoma de la enfermedad. Una VLP del RV de la presente invención que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV puede estimular la producción de anticuerpos que, por ejemplo, neutralizan agentes infecciosos, bloquean la entrada de los agentes infecciosos a las células, bloquean la replicación de los agentes infecciosos y/o protegen las células huésped de la infección y la destrucción. El término también puede referirse a una respuesta inmune que está mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos contra un agente infeccioso o enfermedad, exhibida por un vertebrado (por ejemplo, un humano), que previene o mejora la infección o enfermedad, o reduce al menos un síntoma del mismo.

Como se usa aquí, el término "vertebrado" o "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier miembro del subfilo cordata, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos. Animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas (incluyendo ratas de algodón) y cobayos; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes o de caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, y gansos son también ejemplos no limitativos. Los términos "mamíferos" y "animales" se incluyen en esta definición. Los adultos y los recién nacidos están destinados a ser cubiertos. En particular, los seres humanos, los mamíferos domésticos y los animales de granja son receptores apropiados de una vacuna o terapéutica contra el RV.

Como se usa aquí, el término "partícula tipo virus" (VLP) se refiere a una estructura que en al menos un atributo se asemeja a un virus pero que no ha demostrado ser infecciosa. Las partículas tipo virus de acuerdo con la invención no llevan información genética que codifica para las proteínas de las partículas tipo virus. En general, las partículas tipo virus carecen de un genoma viral y, por lo tanto, no son infecciosas. Además, a menudo se pueden producir partículas tipo virus en grandes cantidades por expresión heteróloga y se pueden purificar fácilmente.

Como se usa aquí, el término "VLP quimérica" se refiere a las VLPs que contienen proteínas, o porciones de las mismas, de al menos dos agentes infecciosos diferentes (proteínas heterólogas). Usualmente, una de las proteínas se deriva de un virus que puede impulsar la formación de VLPs de células huésped. Ejemplos, con propósito ilustrativo, son la proteína M de la gripe aviar y/o la proteína G del RV. Los términos VLPs del RV y VLPs quiméricas pueden usarse indistintamente cuando sea apropiado.

Tal como se utiliza aquí, el término "vacuna" se refiere a una preparación de patógenos muertos o debilitados o de determinantes antigénicos derivados que se utilizan para inducir la formación de anticuerpos o inmunidad contra el patógeno. Se aplica una vacuna para proporcionar inmunidad a la enfermedad, por ejemplo, gripe, que es causada por el virus de la gripe. Además, el término "vacuna" también se refiere a una suspensión o solución de un inmunógeno (por ejemplo, una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV) que se administra a un vertebrado para producir inmunidad protectora, es decir, inmunidad que previene o reduce la gravedad de la enfermedad asociada con la infección. La presente invención proporciona composiciones de vacunas que son inmunogénicas y pueden proporcionar protección contra una enfermedad asociada con la infección.

Partículas Tipo Virus (VLPs) del Virus de la Rabia (RV)

En un aspecto, la invención se refiere a métodos para producir partículas tipo virus (VLPs) del RV que comprenden una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV que pueden formularse en vacunas o formulaciones antigénicas para proteger vertebrados (por ejemplo, humanos y animales domésticos) contra infección del RV o al menos un síntoma de enfermedad del mismo. En algunas realizaciones, la VLP que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV comprende además proteínas del RV adicionales, tales como N, P, M y L. En otras realizaciones, la VLP que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV, comprende además proteínas de cepas heterólogas de virus, tales como las proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe. En una realización, la proteína M1 del virus de la influenza se deriva de una cepa del virus de la gripe aviar (véase la solicitud de Estados Unidos 13/280,043).

Vacunas contra el RV

5 Dado que la infección por el RV puede prevenirse proporcionando anticuerpos neutralizantes a un vertebrado, una
 vacuna que comprende una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV puede
 inducir, cuando se administra a un vertebrado, anticuerpos neutralizantes in vivo. Las VLPs del RV que comprenden
 una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV se usan favorablemente para la prevención y/o el tratamiento de la
 10 infección del RV. Por lo tanto, otro aspecto de esta descripción se refiere a un método para provocar una respuesta
 inmune contra el RV. El método implica la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una
 composición que contiene una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV a un
 sujeto (tal como un sujeto humano o animal). La administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de la
 15 composición provoca una respuesta inmune específica para los epítopos presentes en la proteína G del RV. Dicha
 respuesta inmune puede incluir respuestas de células B (por ejemplo, la producción de anticuerpos neutralizantes)
 y/o respuestas de células T (por ejemplo, la producción de citocinas). Preferiblemente, la respuesta inmune
 provocada por la proteína G del RV incluye elementos que son específicos para al menos un epítipo conformacional
 presente en la proteína G del RV. En una realización, la respuesta inmune es específica para un epítipo presente en
 una proteína G del RV encontrada en la conformación micelar. Las proteínas G y composiciones del RV pueden
 20 administrarse a un sujeto sin aumentar la enfermedad viral después del contacto con el RV. Preferiblemente, las
 proteínas G del RV descritas aquí y composiciones inmunogénicas formuladas adecuadamente provocan una
 respuesta inmune Th1 predispuesta que reduce o previene la infección con un RV y/o reduce o previene una
 respuesta patológica después de la infección con un RV.

25 Las proteínas G del RV producidas por la presente invención se encuentran en forma de micelas (por ejemplo
 rosetas). Ver ejemplo 2. Las micelas se purifican después de la expresión en una célula huésped. Cuando se
 administran a un sujeto, las micelas de la presente invención inducen preferiblemente anticuerpos neutralizantes. En
 algunas realizaciones, las micelas pueden administrarse con un adyuvante. En otras realizaciones, las micelas
 pueden administrarse sin un adyuvante.

30 La solicitud también describe partículas tipo virus (VLP) del RV que comprenden una proteína G del RV que puede
 formularse en vacunas o formulaciones antigénicas para proteger vertebrados (por ejemplo humanos) contra la
 infección por el RV o por lo menos un síntoma de enfermedad de la misma. La presente solicitud también se refiere
 a VLPs del RV y vectores que comprenden genes de tipo salvaje y mutados del RV o una combinación de los
 mismos derivados de diferentes cepas del RV, que cuando se transfectan en células huésped, producirán partículas
 tipo virus (VLP) que comprenden proteínas del RV.

35 En algunas realizaciones, las partículas tipo virus del RV pueden comprender además al menos una proteína matriz
 viral (por ejemplo, una proteína M del RV). En una realización, la proteína M se deriva de una cepa humana del
 RV. En otra realización, la proteína M se deriva de una cepa alternativa del RV, tal como una cepa del RV canina, de
 murciélago, mapache o zorrillo. En otras realizaciones, la proteína matriz puede ser una proteína M1 de una cepa de
 virus de la gripe. En una realización, la cepa del virus de la gripe es una cepa de gripe aviar. En una realización
 40 ejemplar, la cepa de gripe aviar es la cepa H5N1 A/Indonesia/5/05. En otras realizaciones, la proteína matriz puede
 ser del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

En realizaciones adicionales, las VLPs producidas por la invención pueden comprender uno o más inmunógenos
 heterólogos, tales como hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) de la gripe.

45 En algunas realizaciones, la invención también se refiere a la producción de combinaciones de diferentes proteínas
 G, N, P, M y L del RV de las mismas y/o diferentes cepas en una o más VLPs. Además, las VLPs pueden incluir una
 o más moléculas adicionales para la mejora de una respuesta inmune.

En otra realización, las VLPs del RV producidas por la invención pueden llevar agentes tales como ácidos nucleicos,
 ARNsí, ARNmico, agentes quimioterapéuticos, agentes de formación de imágenes y/u otros agentes que necesitan
 ser dados a un paciente.

50 Las VLPs producidas por la invención son útiles para preparar vacunas y composiciones inmunogénicas. Una
 característica importante de las VLPs es la capacidad de expresar proteínas superficiales de interés de modo que el
 sistema inmune de un vertebrado induce una respuesta inmune contra la proteína de interés. Sin embargo, no todas
 las proteínas pueden expresarse en la superficie de las VLPs. Puede haber muchas razones por las cuales ciertas
 proteínas no se expresan, o se expresan pobremente, en la superficie de las VLPs. Una razón es que la proteína no
 está dirigida a la membrana de una célula huésped o que la proteína no tiene un dominio transmembrana. Como
 ejemplo, las secuencias próximas al extremo carboxilo de la hemaglutinina de la gripe pueden ser importantes para
 la incorporación de HA en la bicapa lipídica de las nucleocápsidas maduras envueltas de la gripe y para el montaje
 de la interacción del trómero HA con la proteína M1 matriz de la gripe (Ali et al., (2000) J. Virol. 74, 8709-19).

55 Por lo tanto, las VLPs pueden ser VLPs quiméricas que comprenden una proteína G del RV y al menos un
 inmunógeno que normalmente no se expresa eficientemente en la superficie celular o no es una proteína normal del
 RV. En una realización, la proteína G del RV puede estar fusionada con un inmunógeno de interés. En otra
 realización, la proteína G del RV se asocia con el inmunógeno a través del dominio transmembrana y la cola
 citoplasmática de una proteína heteróloga de membrana de superficie viral, por ejemplo, proteína envolvente MMTV.

Otras VLPs quiméricas comprenden VLPs que comprenden una proteína G del RV y al menos una proteína de un agente infeccioso heterólogo. Ejemplos de agentes infecciosos heterólogos incluyen, pero no se limitan a virus, una bacteria, un protozoo, un hongo y/o un parásito. En una realización, el inmunógeno de otro agente infeccioso es una proteína viral heteróloga. En otra realización, la proteína de un agente infeccioso heterólogo es una proteína asociada al envoltorio. En otra realización, la proteína de otro agente infeccioso heterólogo se expresa en la superficie de las VLPs. En otra realización, la proteína de un agente infeccioso comprende un epítipo que generará una respuesta inmune protectora en un vertebrado. En una realización, la proteína de otro agente de infección se coexpresa con una proteína G del RV. En otra realización, la proteína de otro agente infeccioso se fusiona a una proteína G del RV. En otra realización, sólo una parte de una proteína de otro agente infeccioso se fusiona a una porción de una proteína G del RV. En otra realización, sólo una parte de una proteína de otro agente infeccioso se fusiona a una porción de una proteína G del RV. En otra realización, la porción de la proteína de otro agente infeccioso fusionado a una proteína G del RV se expresa sobre la superficie de las VLPs.

También se describen variantes de las proteínas expresadas sobre o en las VLPs de la invención. Las variantes pueden contener alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas constituyentes. El término "variante" con respecto a una proteína se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, sustitución de leucina por isoleucina. Alternativamente, una variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo, sustitución de una glicina por un triptófano. Las variaciones menores análogas también pueden incluir delección o inserción de aminoácidos, o ambas. La orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin eliminar la actividad biológica o inmunológica puede encontrarse utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

Las variantes naturales pueden ocurrir debido a mutaciones en las proteínas. Estas mutaciones pueden conducir a variabilidad antigénica dentro de grupos individuales de agentes infecciosos, por ejemplo gripe. Por lo tanto, una persona infectada con, por ejemplo, una cepa de la gripe desarrolla anticuerpos contra ese virus, mientras nuevas cepas de virus aparecen, los anticuerpos contra las cepas más antiguas ya no reconocen el nuevo virus y la reinfección puede ocurrir. La presente descripción abarca toda la variabilidad antigénica y genética de proteínas de agentes infecciosos para producir VLPs.

Los textos generales que describen las técnicas de biología molecular, que son aplicables a la presente invención, tales como clonación, mutación y cultivo celular, incluyen Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, California (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 2000 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., ("Ausubel"). Estos textos describen la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados, por ejemplo, con la clonación y mutación de moléculas G del RV, etc. Por lo tanto, pueden usarse métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante para mejorar o alterar las características de las proteínas expresadas sobre o en las VLPs. Pueden usarse diversos tipos de mutagénesis para producir y/o aislar ácidos nucleicos variantes que codifican para moléculas de proteína y/o para modificar/mutar adicionalmente las proteínas en o sobre las VLPs. Estas incluyen pero no se limitan a mutagénesis sitio dirigida, de punto aleatorio, recombinación homóloga (barajado de ADN), mutagénesis usando plantillas que contienen uracilo, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificado con fosforotioato y mutagénesis usando ADN dúplex con brecha. Métodos adicionales adecuados incluyen reparación de incongruencia puntual, mutagénesis, la utilización de cepas huésped deficientes en la reparación, la selección por reducción y la purificación por restricción, mutagénesis por delección, mutagénesis por síntesis de genes totales o reparación de ruptura de doble hebra. También se prevé la mutagénesis, por ejemplo, que implica construcciones quiméricas.

En una realización, la mutagénesis puede guiarse por información conocida de la molécula de origen natural o molécula de origen natural alterada o mutada, por ejemplo, secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas o estructura cristalina.

La solicitud describe adicionalmente variantes de proteínas que muestran una actividad biológica sustancial, por ejemplo, capaces de provocar una respuesta de anticuerpos eficaz cuando se expresan sobre o en VLPs producidas por la invención. Tales variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica, de manera que tienen poco efecto sobre la actividad.

Métodos de clonación de las proteínas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica una proteína del RV específica puede aislarse mediante RT-PCR a partir de ARNm poliadenilado extraído de células que han sido infectadas con virus de la rabia. El gen producto resultante puede clonarse como un inserto de ADN en un vector. El término "vector" se refiere a los medios a través de los cuales un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones y cromosomas artificiales, que se replican de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula huésped. Un vector puede ser también un polinucleótido de ARN desnudo, un

polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto de ADN y ARN dentro de la misma hebra, un ADN o ARN conjugado con poli lisina, un ADN o ARN conjugado con péptido o un ADN conjugado con liposomas, que no se está replicando de manera autónoma. Los vectores utilizados en los métodos de la presente invención son vectores de baculovirus.

- 5 Por lo tanto, la solicitud describe nucleótidos que codifican proteínas, incluyendo moléculas químicas, clonadas en un vector de expresión que puede expresarse en una célula que induce la formación de VLPs. Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido que es capaz de promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Típicamente, el ácido nucleico a expresar está "unido operativamente" a un promotor y/o potenciador, y está sujeto al control de la transcripción regulador por el promotor y/o potenciador. En una realización, los nucleótidos codifican para una proteína G del RV (como se ha discutido anteriormente). En otra realización, el vector comprende además nucleótidos que codifican la proteína M del RV. En otra realización, el vector comprende además nucleótidos que codifican las proteínas M y/o N del RV. En otra realización, el vector comprende además nucleótidos que codifican las proteínas M, L y/o N del RV. En una realización ejemplar, el vector de expresión es un vector de baculovirus.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender mutaciones que contienen alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones o deleciones, pero no alteran las propiedades o actividades de la proteína codificada o de cómo se hacen las proteínas. Las variantes de nucleótidos pueden producirse por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambiar codones en el ARNm humano a los preferidos por células de insecto tales como células Sf9. Véase la Publicación de Paciente de Estados Unidos 2005/0118191.
- 20

Además, los nucleótidos pueden secuenciarse para asegurar que las regiones correctas de codificación fueron clonadas y no contienen ninguna mutación no deseada. Los nucleótidos pueden subclonarse en un vector de expresión (por ejemplo baculovirus) para la expresión en cualquier célula. Lo anterior es sólo un ejemplo de cómo las proteínas víricas del RV pueden ser clonadas. Una persona experimentada en la técnica entiende que los métodos adicionales están disponibles y son posibles.

25

La solicitud describe también estructuras y/o vectores que comprenden nucleótidos del RV que codifican para genes estructurales del RV, incluyendo G, M, N, L, P, o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente. El vector puede ser, por ejemplo, un vector fago, plásmido, viral o retroviral. Las estructuras y/o vectores que comprenden genes estructurales del RV, incluyendo G, M, N, L, P o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente, deberían estar operativamente unidos a un promotor apropiado, tal como el promotor polihedrina AcMNPV (u otro baculovirus), promotor bacteriófago lambda PL, los promotores lac, phoA y tac de E. coli, promotores tempranos y tardíos de SV40 y promotores de LTRs retrovirales son ejemplos no limitativos. Otros promotores adecuados serán conocidos por el experimentado en la técnica dependiendo de la célula huésped y/o el índice de expresión deseado. Las estructuras de expresión van a contener además sitios para la iniciación de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de enlace al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos expresados por las estructuras incluirá preferiblemente un codón iniciador de la traducción al principio y un codón de terminación posicionado apropiadamente en el extremo final del polipéptido a traducir.

30

35

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen reductasa de dihidrofolato, G418 o resistencia a la neomicina para cultivos celulares eucarióticos y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivo en E. coli y otras bacterias. Entre los vectores preferidos están vectores de virus, tales como baculovirus, virus de viruela (por ejemplo, virus vaccinia, virus de viruela aviar, virus de viruela de canario, virus de viruela de aves, virus de viruela de mapache, virus de viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), herpesvirus y retrovirus. Otros vectores que se pueden usar con la invención comprenden vectores para su uso en bacterias, que comprenden pQE70, pQE60 y pQE-9, vectores pBlucscript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, PDR540, pRIT5. Entre los vectores eucarióticos preferidos se encuentran pFastBac1 pW1NEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experimentado en la técnica. En una realización, el vector que comprende nucleótidos que codifican para genes del RV, incluyendo genes G del RV, así como genes para M, N, L, P, o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente, es pFastBac.

40

45

50

Los constructos recombinantes mencionadas anteriormente podrían usarse para transfectar, infectar o transformar y pueden expresar proteínas del RV, incluyendo una proteína G del RV y al menos un inmunógeno. En una realización, la estructura recombinante comprende una G, M, N, L, P, del RV o partes de la misma, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente, en células eucariotas y/o células procariotas. Por lo tanto, la solicitud describe células huésped que comprenden un vector (o vectores) que contienen ácidos nucleicos que codifican para genes estructurales del RV, incluyendo un G del RV; y al menos un inmunógeno tal como, pero no limitado a, N, L y P, del RV o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente, y permite la expresión de genes, incluyendo G, N, L o P del RV o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente en la célula huésped en condiciones que permitan la formación de VLPs.

55

60

Entre las células huésped eucariotas se encuentran levaduras, insectos, aves, plantas, *C. elegans* (o nemátodos) y células huésped de mamífero. Ejemplos no limitativos de células de insecto son, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo, Sf9, Sf21, células de *Trichoplusia ni*, por ejemplo, células High Five y células de *Drosophila* S2. Ejemplos de células huésped de hongos (incluyendo levadura) son *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (K. lactis), especies de *Candida* incluyendo *C. albicans* y *C. glabrata*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris* y *Yarrowia lipolytica*. Ejemplos de células de mamífero son células COS, células de riñón de hámster bebé, células L de ratón, células LNCaP, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK) y células de mono verde africano, células CV1, células HcLa, células MDCK, células Vero y Hcp-2. También se pueden utilizar ovocitos de *Xenopus laevis* u otras células de origen anfibio. Ejemplos de células huésped procariotas incluyen células bacterianas, por ejemplo *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi* y micobacterias.

Los vectores, por ejemplo, vectores que comprenden polinucleótidos de una proteína G del RV y al menos un inmunógeno incluyendo pero no limitado a N, L, P, del RV o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula quimérica descrita anteriormente, pueden transfectarse en células huésped de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos en células eucariotas puede ser por co-precipitación de fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. En los métodos de la presente invención, el vector es un baculovirus recombinante. El baculovirus recombinante se transfecta en una célula Sf9.

Esta aplicación también describe construcciones y métodos que aumentarán la eficiencia de la producción de VLP. Por ejemplo, la adición de secuencias líderes a la G, M, N, L, P, del RV o porciones de las mismas, y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente, puede mejorar la eficiencia de transporte de la proteína dentro de la célula. Por ejemplo, se puede fusionar una secuencia de señal heteróloga con la G, M, N, L, P, del RV o partes de las mismas, y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente. En una realización, la secuencia de señal se puede derivar del gen de una célula de insecto y fusionarse a la G, M, N, L, P, del RV o porciones de las mismas, y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente. En otra realización, el péptido señal es la secuencia de señal de quitinasa, que funciona eficazmente en sistemas de expresión de baculovirus.

Otro método para aumentar la eficiencia de la producción de VLP es optimizar por codón los nucleótidos que codifican el RV incluyendo una proteína G del RV, M, N, L, P, o porciones de los mismos, y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente para un tipo celular específico. En una realización de la presente invención, los ácidos nucleicos están optimizados por codón para la expresión en células de insecto Sf9.

La invención proporciona métodos para producir una VLP en forma de una micela, de acuerdo con las reivindicaciones, que comprende transfectar vectores que codifican por lo menos la proteína G del RV en una célula huésped Sf9 y expresar la proteína G del RV bajo condiciones que permiten la formación de VLP. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas está dentro de la habilidad de una persona con experiencia normal en la técnica.

Los métodos para cultivar células diseñadas para producir VLPs de la invención incluyen, pero no se limitan a, técnicas de cultivo de células por lote, de carga intermitente, continuas y de perfusión. Cultivo celular significa el crecimiento y propagación de células en un biorreactor (una cámara de fermentación) donde las células se propagan y expresan proteína (por ejemplo, proteínas recombinantes) para purificación y aislamiento. Típicamente, el cultivo celular se lleva a cabo en condiciones estériles, temperatura controlada y condiciones atmosféricas en un biorreactor. Un biorreactor es una cámara utilizada para cultivar células en las que pueden controlarse condiciones ambientales tales como temperatura, atmósfera, agitación y/o pH. En una realización, el biorreactor es una cámara de acero inoxidable. En otra realización, el biorreactor es una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, Nueva Jersey). En otra realización, las bolsas de plástico preesterilizadas son bolsas de aproximadamente 50 L a 1000 L.

Las VLP se aíslan a continuación usando métodos que preservan la integridad de las mismas, tal como por centrifugación en gradiente, por ejemplo, cloruro de cesio, sacarosa e iodixanol, así como técnicas de purificación estándar incluyendo, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel.

El siguiente es un ejemplo de cómo las VLPs de la invención pueden prepararse, aislarse y purificarse. Una persona experimentada en la técnica comprenderá que existen métodos adicionales que pueden utilizarse para preparar y purificar VLPs de la invención, por lo que la invención no se limita al método descrito a continuación.

La producción de VLPs de la invención puede comenzar sembrando células Sf9 (no infectadas) en matraces agitadores, permitiendo que las células se expandan y aumenten a medida que las células crecen y se multiplican (por ejemplo de un matraz de 125 ml a una bolsa Wave de 50 L). El medio utilizado para el crecimiento de las células se formula para la línea celular apropiada (preferiblemente medio libre de suero, por ejemplo medio de insecto ExCell-420, JRH). A continuación, las células se infectan con baculovirus recombinante a la multiplicidad más eficaz de infección (por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades formadoras de placa por célula). Una vez que ha ocurrido la infección, la proteína G del RV, y/o cualquier molécula quimérica o

heteróloga descrita anteriormente, se expresan a partir del genoma del virus, se ensamblan por sí solas en VLPs y se secretan de las células aproximadamente 24 a 72 horas después de la infección. Por lo general, la infección es más eficaz cuando las células están en fase de crecimiento log intermedio ($4-8 \times 10^6$ células/ml) y son al menos aproximadamente 90% viables.

5 Las VLPs se pueden cosechar aproximadamente 48 a 96 horas después de la infección, cuando los niveles de VLPs en el medio de cultivo celular están cerca del máximo pero antes de la lisis celular extensa. La densidad y viabilidad de las células Sf9 en el momento de la cosecha puede ser de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con al menos 20% de viabilidad, como se muestra por el ensayo de exclusión del colorante. A continuación, se retira y se clarifica el medio de cultivo. Se puede añadir NaCl al medio de cultivo a 10 una concentración de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,0 M, de manera preferible a aproximadamente 0,5 M, para evitar la agregación de VLPs. La eliminación de células y residuos celulares del medio de cultivo celular que contiene VLPs de la invención se puede llevar a cabo mediante filtración de flujo tangencial (TFF) con un cartucho de filtro, de único uso, de 0,5 o 1,00 μm de fibra hueca preesterilizada o un dispositivo similar.

15 A continuación, las VLPs en el medio de cultivo clarificado pueden concentrarse por ultrafiltración utilizando un cartucho desechable y preesterilizado de fibra hueca con un límite de peso molecular de 500.000. Las VLPs concentradas se pueden diafiltrar contra 10 volúmenes de pH 7,0 a 8,0 solución salina regulada con fosfato (PBS) que contiene 0,5 M de NaCl para eliminar los componentes residuales del medio.

20 Las VLPs concentradas, diafiltradas se pueden purificar aún más sobre un gradiente de sacarosa discontinuo de 20% a 60% en regulador PBS con pH 7,2 con 0,5 M de NaCl mediante centrifugación a $6.500 \times g$ durante 18 horas a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C. Usualmente, las VLPs forman una banda visible distintiva de sacarosa al aproximadamente 30% a aproximadamente 40% o en la interfaz (en un gradiente escalonado de 20% y 60%) que se puede recoger del gradiente y almacenar. Este producto puede diluirse para comprender 200 mM de NaCl en preparación para la siguiente etapa en el proceso de purificación. Este producto contiene VLPs y puede contener partículas de baculovirus intactas.

25 Puede conseguirse una purificación adicional de las VLPs mediante cromatografía de intercambio aniónico, o centrifugación con cojín isopícnico de sacarosa al 44%. En la cromatografía de intercambio aniónico, la muestra del gradiente de sacarosa (véase más arriba) se carga en una columna que contiene un medio con un anión (por ejemplo Matrix Fractogel EMD TMAE) y se elude a través de un gradiente de sal (desde aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 1,0 M de NaCl) que puede separar la VLP de otros contaminantes (por ejemplo baculovirus y ADN/ARN). En el método de cojín de sacarosa, la muestra que comprende las VLPs se añade a un cojín de sacarosa al 44% y se centrifuga durante aproximadamente 18 horas a 30.000 g. Las VLPs forman una banda en la parte superior de la sacarosa al 44%, mientras que el baculovirus se precipita en el fondo y otras proteínas contaminantes permanecen en la capa de sacarosa al 0% en la parte superior. Se recoge el pico o banda de VLP.

35 El baculovirus intacto puede ser inactivado, si se desea. La inactivación se puede conseguir por métodos químicos, por ejemplo, formalina o β -propiolactona (BPL). La eliminación y/o inactivación del baculovirus intacto también se puede lograr en gran medida utilizando procedimientos de precipitación selectiva y cromatográficos conocidos en la técnica, como se ha ejemplificado anteriormente. Los métodos de inactivación comprenden incubar la muestra que contiene las VLPs en 0,2% de BPL durante 3 horas a aproximadamente 25 °C a aproximadamente 27 °C. El baculovirus también puede inactivarse incubando la muestra que contiene las VLPs a 0,05% de BPL a 4 °C durante 40 3 días, a continuación a 37 °C durante una hora.

Después de la etapa de inactivación/eliminación, el producto que comprende VLPs puede hacerse pasar por otra etapa de diafiltración para eliminar cualquier reactivo de la etapa de inactivación y/o cualquier sacarosa residual, y colocar las VLPs en el regulador deseado (por ejemplo, PBS). La solución que comprende VLPs puede ser esterilizada por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, filtración estéril) y almacenada en el refrigerador o 45 congelador.

Las técnicas anteriores se pueden practicar a través de una variedad de escalas. Por ejemplo, matraz en T, matraz de agitación, botellas giratorias, hasta biorreactores de tamaño industrial. Los biorreactores pueden comprender un tanque de acero inoxidable o una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo, el sistema vendido por Wave Biotech, Bridgewater, Nueva Jersey). Una persona experimentada en la técnica sabrá lo que es más deseable para 50 sus propósitos.

La expansión y producción de vectores de expresión de baculovirus puede realizarse en células de insecto, por ejemplo células de insecto Sf9 como se ha descrito previamente. En una realización, las células son Sf9 infectadas con baculovirus recombinante diseñado para producir VLPs del RV.

Formulaciones farmacéuticas o vacunas y administración

55 Las composiciones farmacéuticas útiles aquí contienen un portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, que incluye cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de una respuesta inmune perjudicial para el vertebrado que recibe la composición y que puede administrarse sin toxicidad indebida y una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del

- 5 RV. Tal como se usa aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o estatal o está listado en la Farmacopea de los Estados Unidos, Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en mamíferos y más particularmente en seres humanos. Estas composiciones pueden ser útiles como una vacuna y/o composiciones antigénicas para inducir una respuesta inmune protectora en un vertebrado.
- 10 La solicitud describe una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. En una realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLPs que comprenden al menos una proteína G del RV y al menos un inmunógeno adicional. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLPs que comprenden al menos una proteína G del RV y al menos una proteína M del RV. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLPs que comprenden al menos una proteína G del RV y al menos una proteína M de gripe. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLPs que comprenden al menos una proteína G del RV y al menos una proteína M1 de la gripe aviar.
- 15 La solicitud describe también un kit para inmunizar un vertebrado, tal como un sujeto humano, que comprende VLPs que comprenden al menos una proteína G del RV.
- 20 La solicitud también describe una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.
- 25 La formulación inmunogénica comprende una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a solución salina, solución salina regulada, dextrosa, agua, glicerol, regulador acuoso isotónico estéril y combinaciones de los mismos. Una discusión completa de portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes y otros excipientes se presenta en Remington's Pharmaceutical Sciences (edición actual de Mack Pub Co. Nueva Jersey). La formulación debe adaptarse al modo de administración. En una realización preferida, la formulación es adecuada para administración a seres humanos, preferiblemente es estéril, sin material particulado y/o no es pirogénica.
- 30 La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. La composición puede ser una forma sólida, tal como un polvo liofilizado adecuado para la reconstitución, una solución líquida, suspensión, emulsión, tableta, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc., de calidad farmacéutica.
- 35 La solicitud también describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las formulaciones de vacuna. En una realización, el kit comprende dos recipientes, uno conteniendo una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV, y la otra contiene un adyuvante. Asociado con dicho recipiente o recipientes puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, tal aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.
- 40 La solicitud también prevé que la formulación se empaqueta en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad de la composición. En una realización, la composición se suministra como un líquido, en otra realización, como un polvo seco liofilizado esterilizado o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y se puede reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto.
- 45 En una realización alternativa, la composición se suministra en forma líquida en un recipiente escaldado herméticamente indicando la cantidad y concentración de la composición. Preferiblemente, la forma líquida de la composición se suministra en un recipiente herméticamente sellado al menos aproximadamente 50 µg/ml, de manera más preferible al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 200 µg/ml, al menos 500 µg/ml o al menos 1 mg/ml.
- 50 Como ejemplo, las VLPs del RV que comprenden una o más proteínas G del RV se administran en una cantidad eficaz o cantidad (como se ha definido anteriormente) suficiente para estimular una respuesta inmune, cada una de ellas una respuesta contra una o más cepas del RV. La administración de la VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV provoca inmunidad contra el RV. Típicamente, la dosis se puede ajustar dentro de este intervalo con base en, por ejemplo, edad, estado físico, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y jeringa, o un dispositivo de inyección sin aguja. En una
- 55 realización ejemplar, la formulación de la vacuna se administra intramuscularmente.

Por lo tanto, la invención también comprende un método de formulación de una vacuna, o composición antigénica que induce inmunidad a una infección o al menos un síntoma de enfermedad de la misma a un mamífero, que comprende preparar micelas como se ha descrito previamente y luego añadir a la formulación una dosis efectiva de la micelas que comprenden una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. En una realización, la infección es una
5 infección por el RV

Aunque es posible estimular la inmunidad con una sola dosis, se pueden administrar dosificaciones adicionales, por la misma o diferente ruta, para conseguir el efecto deseado. En recién nacidos y lactantes, por ejemplo, pueden requerirse múltiples administraciones para obtener niveles suficientes de inmunidad. La administración puede continuar a intervalos durante toda la infancia, según sea necesario para mantener niveles suficientes de protección
10 contra infecciones, por ejemplo, infección por el RV. De manera similar, los adultos que son particularmente susceptibles a infecciones repetidas o graves, como por ejemplo, los trabajadores de la salud, los trabajadores de guarderías, los miembros de la familia de niños pequeños, los ancianos y las personas con función cardiopulmonar comprometida pueden necesitar inmunizaciones múltiples para establecer y/o mantener respuestas inmunes protectoras. Los niveles de inmunidad inducida pueden monitorizarse, por ejemplo, midiendo cantidades de
15 anticuerpos neutralizantes secretores y en suero, y las dosificaciones se alteran o las vacunaciones se repiten según sea necesario para provocar y mantener los niveles deseados de protección.

Los métodos para administrar una composición que comprende una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV (por ejemplo, formulaciones de vacuna y/o antigénicas) incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo intradérmica, intramuscular, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, rutas intranasales y orales o pulmonares o por supositorios). En una realización específica, las composiciones de la presente invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica o intradérmica. Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo mucosa oral, colon, conjuntiva, nasofaringe, orofaringe, vagina, uretra, vejiga urinaria y mucosa intestinal, etc.) y pueden
20 administrarse conjuntamente con otros agentes biológicamente activos.

Las vacunas y/o formulaciones inmunogénicas también se pueden administrar en un programa de dosificación, por ejemplo, una administración inicial de la composición de vacuna con las administraciones de refuerzo posteriores. En realizaciones particulares, se administra una segunda dosis de la composición de dos semanas a un año, de manera preferible de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 a aproximadamente 6 meses, después de la administración inicial. Además, se puede administrar una tercera dosis después de la segunda dosis y desde aproximadamente tres meses a aproximadamente dos años, o incluso más, de manera preferible aproximadamente 4, aproximadamente 5, o aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 7 meses a aproximadamente un año después de la administración inicial. La tercera dosis puede administrarse opcionalmente cuando no se detectan niveles o se detectan niveles
30 bajos de inmunoglobulinas específicas en las secreciones de suero y/u orina o mucosas del sujeto después de la segunda dosis. En una realización preferida, se administra una segunda dosis aproximadamente un mes después de la primera administración y se administra una tercera dosis aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otra realización, la segunda dosis se administra aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otra realización, las composiciones se pueden administrar como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, las composiciones producidas aquí pueden formularse con otras composiciones inmunogénicas, antivirales y/o antibióticos.

La dosificación de la composición farmacéutica puede ser determinada fácilmente por una persona experimentada en la técnica, por ejemplo, identificando primero dosis eficaces para provocar una respuesta inmune profiláctica o terapéutica, por ejemplo, midiendo el título en suero de inmunoglobulinas específicas de virus o midiendo la relación inhibitoria de anticuerpos en muestras de suero, o muestras de orina, o secreciones mucosas. Las dosificaciones se pueden determinar a partir de estudios en animales. Una lista no limitativa de animales utilizados para estudiar la eficacia de las vacunas incluyen el cobayo, el hámster, los hurones, la chinchilla, el ratón y la rata de algodón. La mayoría de los animales no son huéspedes naturales de agentes infecciosos, pero pueden servir en estudios de
45 varios aspectos de la enfermedad. Por ejemplo, cualquiera de los animales anteriores puede dosificarse con una vacuna candidata, por ejemplo, una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV, para caracterizar parcialmente la respuesta inmune inducida, y/o para determinar si se han producido anticuerpos neutralizantes. Por ejemplo, se han realizado muchos estudios en el modelo de ratón porque los ratones son de tamaño pequeño y su bajo coste permite a los investigadores realizar estudios a mayor escala.

Además, se pueden realizar estudios clínicos en seres humanos para determinar la dosis eficaz preferida para seres humanos por una persona experimentada. Dichos estudios clínicos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. La dosis precisa a emplear también dependerá de la vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de pruebas in vitro o en animales.

Como también es bien conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición particular puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes se han utilizado experimentalmente para promover un aumento generalizado de la inmunidad contra antígenos desconocidos (por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4,877,611). Los protocolos de inmunización
60

han usado adyuvantes para estimular las respuestas durante muchos años, y como tal, los adyuvantes son bien conocidos por alguien de experiencia regular en la técnica. Algunos adyuvantes afectan la forma en que se presentan los antígenos. Por ejemplo, la respuesta inmune aumenta cuando los antígenos proteicos son precipitados por el alumbre. La emulsificación de antígenos también prolonga la duración de la presentación del antígeno. La inclusión de cualquier adyuvante descrito en Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)", se contempla dentro del alcance de esta invención.

Ejemplarmente, los adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene Mycobacterium tuberculosis muerto), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio. Otros adyuvantes comprenden GMCSP, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A y monofosforil lípido A (MPL). También se contempla el RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween 80. También se pueden usar los antígenos MHC, MF-59, Novasomes®.

En una realización de la invención, el adyuvante es una vesícula lipídica paucilamelar que tiene aproximadamente de dos a diez bicapas dispuestas en forma de conchas sustancialmente esféricas separadas por capas acuosas que rodean una cavidad central amorfa grande libre de bicapas lipídicas. Las vesículas lipídicas paucilamelares pueden actuar para estimular la respuesta inmune de varias maneras, como estimuladores no específicos, como portadores para el antígeno, como portadores de adyuvantes adicionales, y combinaciones de los mismos. Las vesículas lipídicas paucilamelares actúan como estimuladores inmunes no específicos cuando, por ejemplo, se prepara una vacuna entremezclando el antígeno con las vesículas preformadas de tal manera que el antígeno permanece extracelular a las vesículas. Al encapsular un antígeno dentro de la cavidad central de la vesícula, la vesícula actúa tanto como un estimulador inmune como un portador para el antígeno. En otra realización, las vesículas están hechas principalmente de vesículas no fosfolípidas. En otra realización, las vesículas son Novasomes®. Las Novasomes® son vesículas no fosfolípidas paucilamelares que van desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 500 nm. Comprenden Brij 72, colesterol, ácido oleico y escualeno. Se ha demostrado que los novasomas son un adyuvante eficaz para los antígenos de la gripe (ver, Patentes de Estados Unidos 5,629,021, 6,387,373 y 4,911,928).

Las composiciones producidas por la invención también se pueden formular con "estimuladores inmunes". Estos son los propios mensajeros químicos del cuerpo (citocinas) para aumentar la respuesta del sistema inmunológico. Los estimuladores inmunes incluyen, pero no se limitan a, diversas citocinas, linfoquinas y quimioquinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de la colonia de granulocitomacrófago (GM) (CSF)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que las composiciones producidas por la invención, o pueden administrarse por separado. Se puede administrar la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína para producir un efecto inmunoestimulante. Por lo tanto, en una realización, la invención produce una formulación antigénica y de vacuna que comprende un adyuvante y/o un estimulador inmune.

Métodos para la estimulación de una respuesta inmune

Las VLPs del RV que comprenden una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV son útiles para preparar composiciones que estimulan una respuesta inmune que confiere inmunidad o inmunidad sustancial a agentes infecciosos. Por consiguiente, se describe aquí un método para inducir inmunidad a infecciones o al menos un síntoma de enfermedad de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

En un aspecto, se describe un método para inducir inmunidad a la infección por el RV o al menos un síntoma de enfermedad de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV. En una realización, el sujeto es un vertebrado. En otra realización, el vertebrado es un mamífero. En aún otra realización, el mamífero es un ser humano. En aún otra realización, el mamífero es un animal doméstico. En otra realización, el método comprende inducir inmunidad a la infección por el RV o al menos un síntoma de la enfermedad administrando la formulación en una dosis. En otra realización, el método comprende inducir inmunidad a la infección por el RV o al menos un síntoma de la enfermedad administrando la formulación en dosis múltiples.

Las composiciones producidas por la invención pueden inducir una inmunidad sustancial en un vertebrado (por ejemplo, un humano) cuando se administra al vertebrado. La inmunidad sustancial resulta de una respuesta inmune contra composiciones de la invención que protege o mejora la infección o al menos reduce un síntoma de infección en el vertebrado. En algunos casos, si el vertebrado está infectado, la infección será asintomática. La respuesta puede no ser una respuesta completamente protectora. En este caso, si el vertebrado está infectado con un agente infeccioso, el vertebrado experimentará síntomas reducidos o una duración más corta de los síntomas en comparación con un vertebrado no inmunizado.

En otra realización, la solicitud describe un método para inducir una respuesta de anticuerpo protector a una infección o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV .

5 Como se usa aquí, un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados, sustancial o parcialmente, por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como una miríada de genes de inmunoglobulina de región variable. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural típica de
10 inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son los principales responsables del reconocimiento del antígeno. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por
15 digestión con diversas peptidasas.

En una realización, la solicitud describe un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por el RV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de VLP del RV que comprende una o más glicoproteínas (proteínas G) del RV.

20 Como se mencionó anteriormente, las composiciones inmunogénicas producidas por la invención previenen o reducen al menos un síntoma de infección por el RV en un sujeto. Los síntomas del RV son bien conocidos en la técnica. Incluyen fiebre, dolor de cabeza y debilidad o molestia general. A medida que avanza la enfermedad, aparecen síntomas más específicos que pueden incluir insomnio, ansiedad, confusión, parálisis leve o parcial, excitación, alucinaciones, agitación, hipersalivación (aumento de la saliva), dificultad para tragar e hidrofobia (miedo al agua). Por lo tanto, el método descrito aquí comprende la prevención o reducción de al menos un síntoma
25 asociado con infección por el RV. Por ejemplo, la reducción en un síntoma puede ser determinada subjetiva u objetivamente, por ejemplo, la autoevaluación por un sujeto, la evaluación de un médico clínico o la realización de un ensayo o medida apropiados (por ejemplo, la temperatura del cuerpo), incluyendo, por ejemplo, una evaluación de la calidad de vida, la progresión retrasada de una infección por el RV o síntomas adicionales, una severidad reducida de los síntomas del RV o ensayos adecuados (por ejemplo, titulación de anticuerpos y/o ensayo de activación de células T). La evaluación objetiva comprende evaluaciones tanto animales como humanas.

30 Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 Purificación de las partículas G de la rabia para el estudio animal

El propósito de este ejemplo es demostrar cómo se purificaron partículas G tipo virus del RV después de la expresión a partir de vectores de baculovirus en células de insecto Sf9.

Para estructurar las VLPs del RV, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G del RV (SEQ ID NO: 2) se expresó a partir del vector baculovirus (pFastBac1 Rabia G) mostrado en la Figura 1.

40 Las células de insecto Sf9 se infectaron a $2,5 \times 10^6$ células/ml con una MOI de 0,2. Las células se cosecharon a las 69 horas post infección por centrifugación a 4000 g durante 15 minutos. Las células se lavaron con PBS 1X, se centrifugaron de nuevo y se congelaron a -70°C .

45 Se usó una pella celular de 23 gramos obtenida de un cultivo de células de aproximadamente 2L. La pella celular se resuspendió con 200 ml de 2,5 mM de TrisCL pH 8,0, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,5%, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina. Se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se centrifugó a 7000 g durante 60 minutos a 4°C y se reservó 200 ml de sobrenadante para cromatografía.

50 Una vez completada la extracción de G839 de la Rabia a partir de la pella celular, las proteínas solubles se cargaron en una columna de cromatografía Fractogel EMD TMAE Hicap (M). Las especificaciones de la columna fueron las siguientes: Fabricante de la columna: GE Healthcare; Tipo de columna: XK50f20; Fabricante de la resina: EMD Chemicals; Tipo de resina: Fractogel EMD TMAE Hicap (M); Dimensiones de la columna empacada: aproximadamente 10 cm de altura x 5,0 cm de diámetro; volumen de la columna empacada: 200 ml; magnitud de flujo de empacado: 30 ml/min; regulador de empacado: 25 mM de Tris pH 8,0/ 300 mM de NaCl.

55 Las especificaciones del proceso de intercambio aniónico fueron las siguientes: rata de flujo en funcionamiento: 20 ml/min; regulador equilibrador de la columna: 25 mM de Tris pH 8,0, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Eluyente A: 25 mM de Tris pH 8,0, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Eluyente B1: 25 mM de Tris pH 8,0, 180 mM de NaCl, NP9 al

0,02%; Eluyente B2: 25 mM de Tris pH 8.0, 500 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Eluyente B3: 25 mM de Tris pH 8.0, 1500 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Carga en columna: 200 ml de sobrenadante de extracción de G VLP de la rabia; Lavado en columna después de carga: 2 CV de eluyente A; Elución en columna: 2 CV de eluyente B1, 2 CV de eluyente B2, 2 CV de eluyente B3.

- 5 La recolección de las principales fracciones y los volúmenes fueron los siguientes: Fracción de flujo pasante: 250 mL; elución B1 de 180 mM de NaCl: 175 ml (producto); elución B2 de 500 mM de NaCl: 100 ml; elución B3 de 1500 mM de NaCl: 100 ml.

10 La fracción de elución de 180 mM de NaCl de la columna TMAE se cargó sobre una columna de lectina de lenteja. Las especificaciones de la columna fueron las siguientes: Fabricante de la columna: GE Healthcare; Tipo de columna: XK16/20; Fabricante de la resina: GE Healthcare; Tipo de resina: Sefarosa de lectina de lenteja 4B; Número de catálogo de la resina: 17-0444-01; Dimensiones de la columna empacada: 2,5 cm de altura x 1,6 cm de diámetro; Volumen de la columna empacada: aproximadamente 5 ml; rata de flujo de empaque: 2,5 ml/min; regulador de empaque: 25 mM de NaHPO₄ pH 6,8, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; rata de flujo en funcionamiento: 2 ml/min; regulador equilibrador de la columna: 25 mM de NaHPO₄ pH 6,8, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Eluyente A: 25 mM de NaHPO₄ pH 6.8, 50 mM de NaCl, NP9 0,02%, Eluyente B: 25 mM de NaHPO₄ pH 6.8, 50 mM de NaCl NP9 al 0,02%, 500 mM de metil-alfa-dmannopironosidos (Fisher Scientific); Carga en columna: 175 ml de G839 TMAE de la Rabia Elución de 180 mM de NaCl; Lavado en columna después de carga: 5 CV con el eluyente A; Elución en columna: 10 CV con el eluyente B;

20 La recolección de las principales fracciones y los volúmenes fueron los siguientes: Fracción de flujo pasante: 180 ml; Fracción de elución: 30 ml (producto).

25 La elución de lectina de lenteja se cargó en una columna de cromatografía Fractogel EMD SO3-Hicap (M). Las especificaciones de la columna fueron las siguientes: Fabricante de la columna: GE Healthcare; Tipo de columna: XK16/20; Fabricante de la resina: EMD Chemicals; Tipo de resina: Fractogel EMD SO3-Hicap (M); Dimensiones de la columna empacada: 5 cm de altura x 1,6 cm de diámetro; Volumen de la columna empacada: 10 ml; rata de flujo de empaque: 7,5 ml/min; regulador de empaque: 25 mM de NaHPO₄ pH 6.8, 50 mM de NaCl, NP9 al 0.02%.

30 Las especificaciones del proceso de intercambio catiónico fueron las siguientes: rata de flujo en funcionamiento: 5 ml/min; regulador equilibrador de la columna: 25 mM de NaHPO₄ pH 6.8, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Eluyente A: 25 mM de NaHPO₄ pH 6.8, 50 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Eluyente B: 25 mM de NaHPO₄ pH 6.8, 300 mM de NaCl, NP9 al 0,02%; Carga en columna: 30 ml de elución de lectina de lenteja G839 de la rabia; Lavado en columna después de carga: 3 CV con el eluyente A; Elución en columna: eluyente 4 CV de etapa de elución B; recolección de las principales fracciones y los volúmenes: Fracción de elución: 9 ml (producto final); Filtro 9 ml de columna de SO3 - producto de elución de 300 mM de NaCl con filtro de 0,2 µm; Fabricación del filtro (0,2 µm): Corning; Tipo de filtro: filtro de jeringa de 28 mm con una membrana SFCA de 0,2 micras.

35 Se realizó el método de Western blot usando sueros de conejo G anti RV (Figura 2). La pureza de partículas G del RV usando las condiciones anteriores fue del 86%. La cantidad de proteína total fue de 0,39 mg/ml, y la concentración de partículas G del RV fue de 0,33 mg/ml, con un total de 2,97 mg de partículas G del RV de un cultivo de células de 2 L, con un rendimiento de aproximadamente 1,5 mg/L de cultivo celular. De manera importante, las partículas G del RV eran estables a 4 °C durante al menos un mes (datos no mostrados).

Ejemplo 2

40 Microscopía electrónica para el análisis de la conformación de la proteína G del RV

45 La proteína purificada G del RV se analizó mediante microscopía electrónica de tinción negativa (véase la figura 3). El peso molecular medio de las partículas G del RV con NP9 al 0,02% fue $1,04 \times 10^{-6}$. Los trímeros de proteínas presentaban un peso molecular de 175,5 kDa y el número medio de trímeros en una partícula era 5,9. Las proteínas G del RV se agregaron en forma de micelas (rosetas). El hecho de que los picos G exhiben la morfología de las micelas bajo microscopía electrónica sugiere que las partículas de la proteína G tienen la estructura tridimensional correcta de una proteína nativa.

Ejemplo 3

Las partículas G del RV inducen altos niveles de anticuerpos en conejos

50 Para probar la capacidad de las partículas G del RV para inducir una respuesta inmune, se le administró a conejos partículas G del RV a concentraciones variables. Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 4. Las partículas G del RV fueron capaces de inducir altos niveles de anticuerpos en conejos.

Ejemplo 4

Ensayo de neutralización del RV y estudios de exposición de RV en ratones

Para probar la eficacia de una vacuna que comprende VLPs del RV que comprenden una o más proteínas G en la protección contra la infección por el RV, se realizan ensayos de neutralización en ratones. Brevemente, se inyectan grupos de ratones por vía intramuscular con VLPs del RV o VLPs del RV + un adyuvante, tal como aluminio. Además, se inyecta a los ratones Rabipur®, una vacuna del virus de la rabia inactivada disponible comercialmente, que se utiliza como un agente de vacuna comparativo. Se espera generalmente que las VLPs del RV que comprenden una o más proteínas G (es decir, micelas G del RV) induzcan títulos más altos de anticuerpos neutralizantes en comparación con Rabipur®.

Ejemplo 5

Comparación del título de antirrábicos en ratones Balb/c inyectados con partículas G del RV o Rabipur®, la vacuna comercial contra la rabia

La inmunogenicidad de las VLPs de la presente invención se comparó con la vacuna comercial contra la rabia Rabipur® en un modelo de ratón Balb/c. Las partículas G VLP del RV se prepararon y purificaron como se describe en el Ejemplo 1. Las VLPs se agregaron en forma de micelas (Figura 3).

El estudio incluyó cuatro grupos (n=5 para cada grupo):

Grupo I: control positivo (vacuna comercial contra la rabia Rabipur®)

Grupo II: G VLP del RV (5 µg)

Grupo III: G VLP del RV (2 µg)

Grupo IV: G VLP del RV (1 µg)

A los ratones se les administró el inmunógeno respectivo de 0,1 mL en los días 0, 3 y 7. Se tomaron muestras de suero de los ratones en los días 0, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35. Se analizó por ELISA el suero para detectar anticuerpos antirrábicos neutralizantes.

En la tabla 1 a continuación se presenta un resumen del diseño del estudio.

Parámetro	Título de antirrábicos en suero por ELISA (neutralizante)			
Analitos	Suero			
Identificación	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
	control positivo	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Número de ratones	5	5	5	5
Inmunógeno	Vacuna comercial de la rabia Rabipur®	G VLP del RV (5 µg)	G VLP del RV (2 µg)	G VLP del RV (1 µg)
Calendario de inmunización	0.1 mL, I/D, Día 0, 3, 7			
sangrados (días)	0, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35			
Analito	suero para título neutralizante de antirrábicos			

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos neutralizantes antirrábicos se midieron en sueros de ratón en los puntos de tiempo proporcionados anteriormente. Los títulos se representaron como la media geométrica para cada medición (Figura 6). Como muestra la Figura 6, las micelas de VLP de la presente invención, a cada dosificación, proporcionan títulos de anticuerpos más rápidos y más altos que la vacuna Rabipur® comercialmente disponible. Específicamente, la G VLP del RV proporcionó un título de seroprotección (0,5 EU/mL) días antes que la vacuna Rabipur® (Figura 6, Tabla 2).

La Tabla 2 también muestra el porcentaje de seroprotección (es decir, un título de anticuerpo neutralizante de ≥0,5 EU/mL) para cada grupo de inmunización. La tabla indica que la seroprotección ocurre más rápidamente en animales tratados con la G VLP del RV de la presente invención (en todas las tres dosis), en comparación con los animales a los que se administró la vacuna Rabipur®.

Identificación	% seroprotección en el día (n=5)						
	0	7	10	14	21	28	35
Solo Rabipur® (Grupo 1)	0	0	40	60	60	60	60
G VLP del RV (5 µg) (Grupo II)	0	0	60	100	100	100	100
G VLP del RV (2 µg) (Grupo III)	0	40	80	100	100	100	100
G VLP del RV (1 µg)	0	0	60	100	100	100	100

No es una admisión de que cualquiera de la información proporcionada aquí sea técnica anterior o relevante para las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación mencionada de forma específica o implícita sea técnica anterior.

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que lo entendido comúnmente por alguien de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

Aunque la solicitud se ha dividido en secciones para dirigir la atención del lector a realizaciones específicas, tales secciones no deben ser interpretadas como una división entre las realizaciones. Las enseñanzas de cada sección y las realizaciones descritas en ellas son aplicables a otras secciones.

10 Listado de secuencia

<110> Novavax Inc. Smith, Gale Liu, Ye

<120> Partículas de glicoproteínas tipo virus de la rabia (VLPs)

<130> NOV-047/01WO

<150> documento US 61/410,767

15 <151> 2011-11-05

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1575

20 <212> ADN

<213> virus de la rabia

<400> 1

ES 2 636 965 T3

atggtgcccc aggctctgct cttcgtgcct ttgctggctct tcccactctg cttcggcaag 60
 ttccccatct acaccatccc tgacaagctg ggcccctggg cccctatcga catccaccac 120
 ttgtcttgcc ctaacaacct ggtggctgag gacgaaggct gcactaactt gtccggattc 180
 tcttacatgg agctgaaagt gggttacatc tccgctatca agatgaacgg cttcacttgc 240
 accggagtgg tcaccgaggc cgaaacttac accaacttcg tgggctacgt caccactacc 300
 ttcaagagga agcacttcag accaactccc gacgcttgca gggctgccta caactggaag 360
 atggccggag acccaagata cgaggaatcc ctgcacaacc cttaccaga ctaccactgg 420
 ctccgtaccg tgaagactac caaggagtcc ctggatcatc tctccccatc tgtcgtgac 480
 ctcgaccct acgaccgtag cttgactca agagtcttcc cagggtgaaa ctgcagcggg 540
 gtggcctct cctctactta ctgctcaacc aaccacgact aactatctg gatgccagag 600
 aacccccgcc tgggcatgag ctgogacatc ttcaccaact cacgtggaaa gcgcgctcc 660
 aagggttctg agacttgagg cttcgtggac gaaaggggtt tgtacaagtc cctgaagggc 720
 gcttgcaagc tcaagttgtg cggcgtgctg ggactcagat tgatggacgg cacctgggtc 780
 gccatgcaga ctagcaacga gaccaagtgg tgccccctg gacaactcgt gaacttgac 840
 gacttccgtt cagacgagat cgaacacctg gtggctgagg aactcgtcaa gaagcgcgag 900
 gaatgcctgg acgctctcga gagcatcatg actaccaaga gcgtgtcatt ccgtcgcttg 960
 tcacacctga ggaagctcgt ccccggtttc ggcaaggcct aactatctt caacaagacc 1020
 ctcatggagg ctgacgcca ctacaagtcc gtgogtacct ggaacgaaat catcccctct 1080
 aagggttgcc tgcgtgctcg aggtagatgc caccctcacg tgaacggagt cttcttcaac 1140
 ggtatcatcc tgggtcctga cggcaacgtg ctcatcccag agatgcaaag ctactcttg 1200
 cagcaacaca tggaactgct cgtgtcctct gtcacccctc tcatgcacc attggctgac 1260
 cccagcaccg tcttcaagaa cggcgacgag gccgaagact tcgtggaggt ccacctgcca 1320
 gacgtgcacg aacgcatctc cggagctgac ctgggtctcc ccaactggg aaagtacgtg 1380
 ttgctgtctg ctggtgccct caccgctttg atgctgatca tcttcttgat gacttgctgg 1440
 aggagagtca acaggtctga gcctactcag cacaacctga ggggaaccgg tagagaagtg 1500
 tcogtcactc cacaatctgg aaagatcatc agctcatggg agagctaaa gtcaggcggg 1560
 gaaaccggtc tgtaa 1575

<210> 2

<211> 524

<212> PRT

5 <213> virus de la rabia

<400> 2

ES 2 636 965 T3

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro
20 25 30

Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val
35 40 45

Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Lys Val Gly Tyr Ile Ser Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe Thr Cys
65 70 75 80

Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr Asn Phe Val Gly Tyr
85 90 95

Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro Asp Ala
100 105 110

Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly Asp Pro Arg Tyr Glu
115 120 125

Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr His Trp Leu Arg Thr Val
130 135 140

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

Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg Val Phe Pro Gly Gly

ES 2 636 965 T3

Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asn Gly Asp Glu Ala Glu
 420 425 430

Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Glu Arg Ile Ser Gly
 435 440 445

Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr Val Leu Leu Ser Ala
 450 455 460

Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Trp
 465 470 475 480

Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr
 485 490 495

Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser
 500 505 510

Trp Glu Ser Tyr Lys Ser Gly Gly Glu Thr Gly Leu
 515 520

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar micelas que comprenden glicoproteínas (proteínas G) del virus de la rabia (RV), en el que las proteínas G forman un trímero que comprende:
- 5 (a) transformar una célula huésped de insecto Sf9 con un vector de baculovirus que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína G del RV;
- (b) cultivar dicha célula huésped para expresar el ácido nucleico; y
- (c) purificar la proteína G del RV en forma de micelas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico es optimizado por codón para la expresión en dichas células huésped.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína G del RV comprende la SEQ ID NO: 2.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína G del RV se deriva de una cepa del RV seleccionada de humano, canino, murciélago, mapache, mofeta y zorro.
5. Un método para preparar una vacuna o composición antigénica, que comprende preparar micelas que comprenden glicoproteínas del virus de la rabia por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y que comprende además una etapa de formulación de las micelas como una vacuna o composición antigénica añadiendo una dosis efectiva de las micelas a la composición.
- 15 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha composición comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.
7. El método de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que la composición comprende un adyuvante.
- 20 8. El método de la reivindicación 7, en el que el adyuvante es un adyuvante de aluminio.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la micela es capaz de aumentar la producción de anticuerpos proteína anti G en un huésped.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dichos anticuerpos de la proteína anti G son anticuerpos neutralizantes.
- 25 11. El método de la reivindicación 9, en el que dichos anticuerpos de la proteína anti G son protectores.
12. El método de la reivindicación 9, en el que las micelas son capaces de inducir la producción de anticuerpos de la proteína anti G en el huésped después de la administración de una dosis única.
13. El método de la reivindicación 9, en el que las micelas son capaces de proporcionar un título seroprotector en 7 días.

30

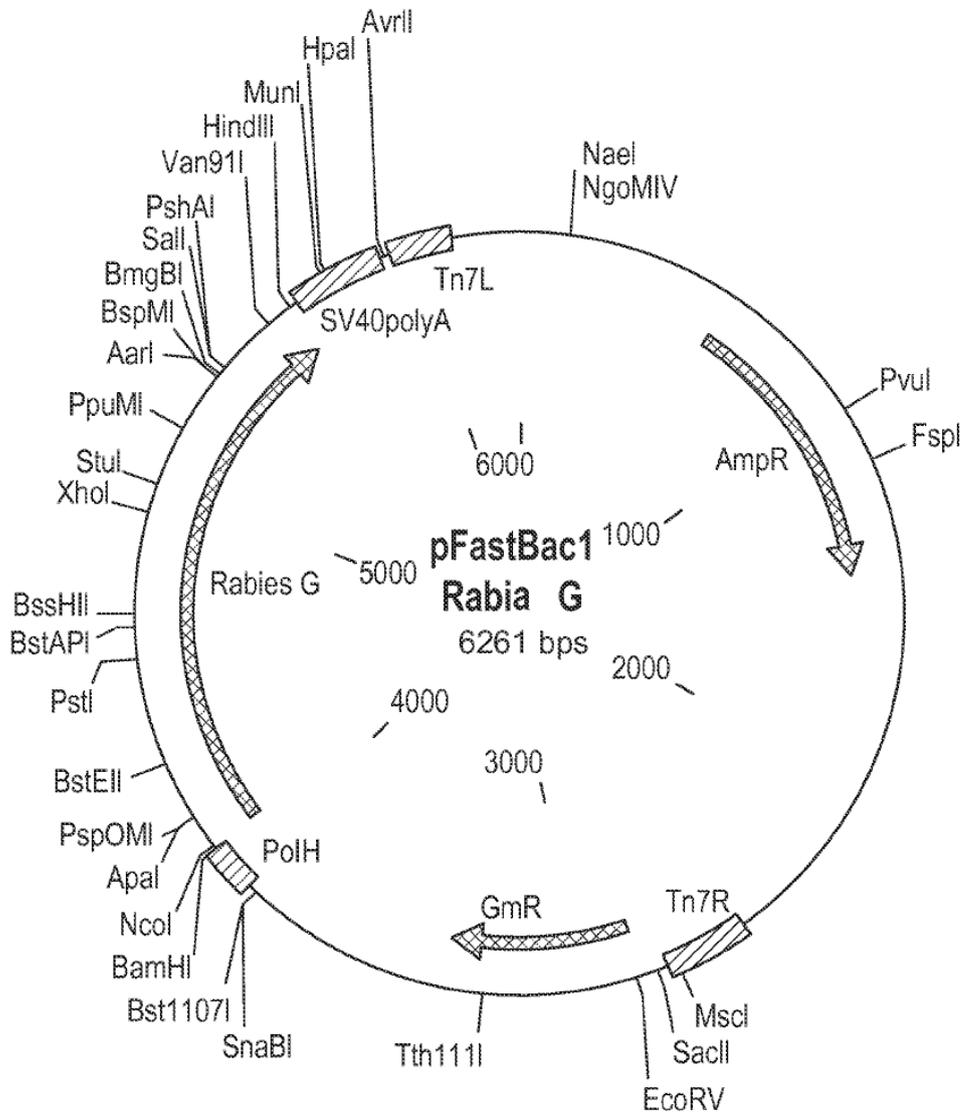


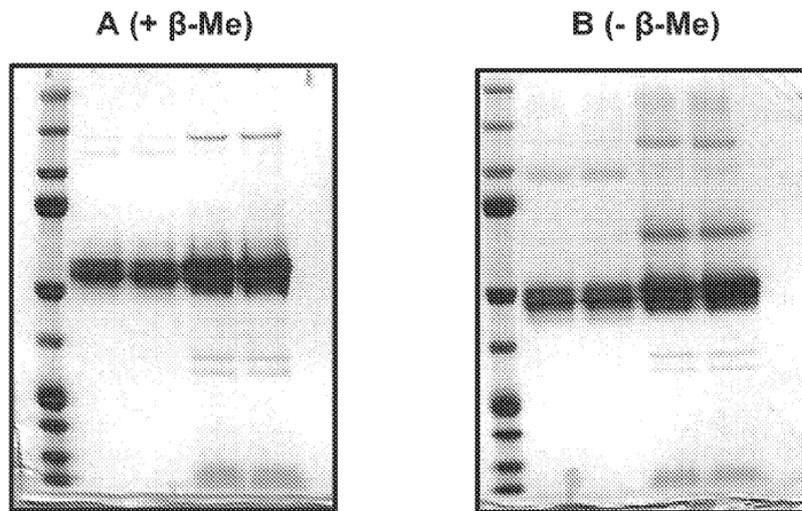
FIG. 1

Muestra	Lote	ID de muestra	BCA-mg/ml	DNA- μ g/ml	BV-ELISA- μ g/ml
2	031810	Rabia G839	0,39	0,34	5,5

Muestra	Lote	ID de muestra	Esterilidad	LA LEU/ml	Placa pfu/ml
2	031810	Rabia G839 (DIL)	negativo	0,41	ND @ 10^{-1} y 10^{-2}

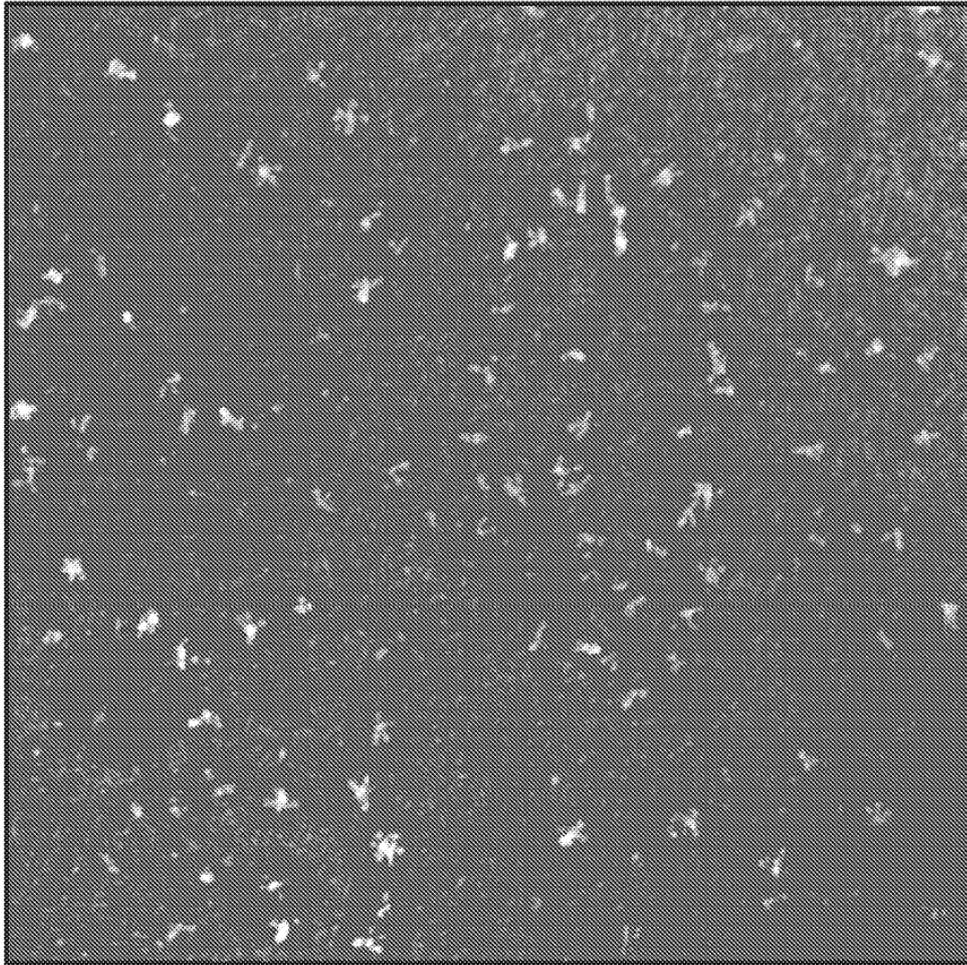
ID de muestra

Lote #	Descripción	Línea	Banda	MW	% de pureza de banda
031810	Rabia G839	4	rabia	54,0	85,2
031810	Rabia G839	5	rabia	54,6	86,1



Línea 1: precisión más estándar de proteína
 Línea 2: proteína G del RV (lote 021610)
 Línea 3: proteína G del RV (lote 021610)
 Línea 4: proteína G del RV (lote 031810)
 Línea 5: proteína G del RV (lote 031810)

FIG. 2

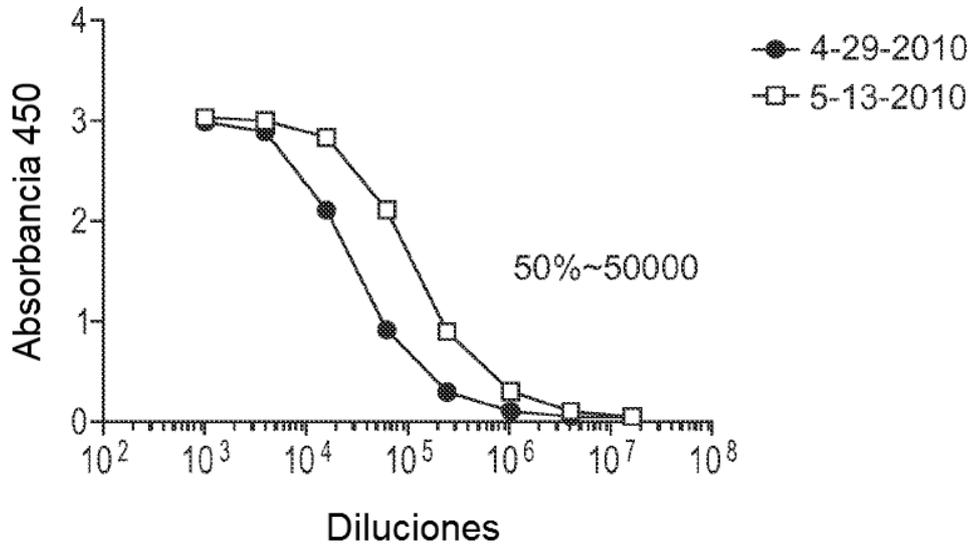


y1-rab-g-lot02610-1-150-UA-42162-m3-8.tif
Mag. de impresión: 57600x @ 51mm
12:27 02/18/10

100 nm
Mag. Directa: 150000x

FIG. 3

Rabia de conejo #181 Titulo de IgG



Rabiya de conejo #182 Titulo de IgG

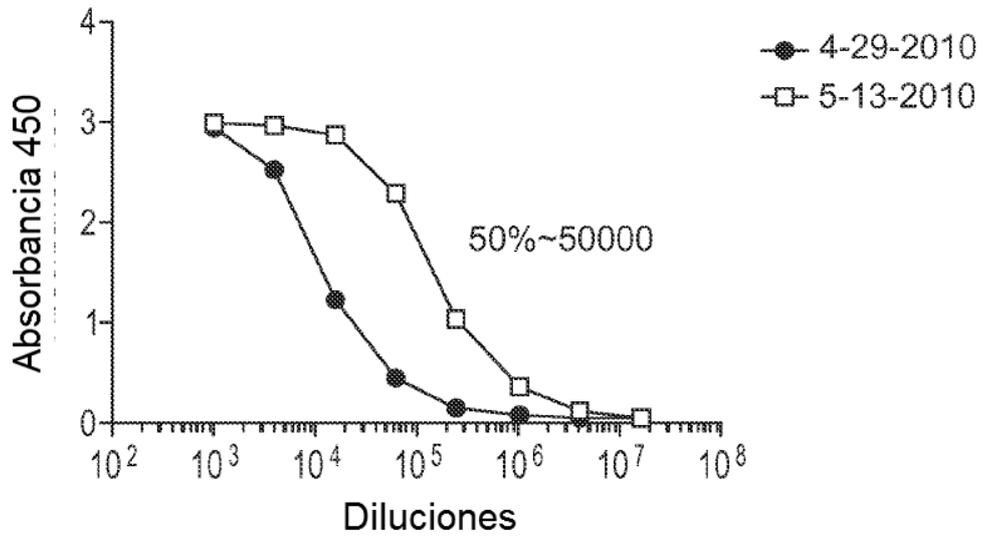


FIG. 4

SEQ ID NO: 1

ATGGTGCCCCAGGCTCTGCTCTTCGTCCTTTGCTGGTCTTCCCACTCTGCTTCGGCAAGTTCCCCATCTACACC
 ATCCCTGACAAGCTGGGCCCCGGTCCCCTATCGACATCCACCCTTGTCTTGCCCTAACCAACCTGGTGGTTCGAG
 GACGAAGGCTGCACCTAACTTGTCCGGATTCTCTTACATGGAGCTGAAAGTGGGTTACATCTCCGCTATCAAGATG
 AACGGCTTCACTTGCACCGGAGTGGTACCGAGGCCGAAACTTACACCAACTTCGTGGGCTACGTCACCCTACC
 TTCAAGAGGAAGCACTTCAGACCAACTCCCGACGCTTGCAGGGCTGCCTACAACCTGGAAGATGGCCGGAGACCCA
 AGATACGAGGAATCCCTGCACAACCCTTACCCAGACTACCCTGGCTCCGTACCGTGAAGACTACCAAGGAGTCC
 CTGGTCATCATCTCCCATCTGTGCTGACCTCGACCCCTACGACCGTAGCTTGCCTCAAGAGTCTTCCCAGGT
 GGAACTGCAGCGGAGTGGCCGTCTCCTTACTTACTGCTCAACCAACCAGACTACACTATCTGGATGCCAGAG
 AACCCCGCCTGGGCATGAGCTGGACATCTTCAACCAACTCACGTGGAAAGCGCCCTCCAAGGTTCTGAGACT
 TCGGGCTTCGTGGACGAAAGGGTTTGTACAAGTCCCTGAAGGGCGCTTGAAGCTCAAGTTGTGCGGCGTGTG
 GGACTCAGATTGATGGACGGCACCTGGGTCGCCATGCAGACTAGCAACGAGACCAAGTGGTGGCCCCCTGGACAA
 CTCGTGAACCTGCACGACTTCCGTTTCAGACGAGATCGAACACCTGGTGGTTCGAGGAACTCGTCAAGAAGCGCGAG
 GAATGCCTGGACGCTCTCGAGAGCATCATGACTACCAAGAGCGTGTTCATTCGTCGCTTGTACACCTGAGGAAG
 CTCGTCCCCGGTTTCGGCAAGGCCTACACTATCTTCAACAAGACCCCTCATGGAGGCTGACGCCCACTACAAGTCC
 GTGCGTACCTGGAACGAAATCATCCCTCTAAGGGTTGCCTGCGTGTGCGGAGGTAGATGCCACCTCACGTGAAC
 GGAGTCTTCTTCAACGGTATCATCTGGGTCCTGACGGCAACGTGCTCATCCAGAGATGCAAGCTCACTCTTG
 CAGCAACACATGGAAGTGTGCTGCTCTGTCTCATCCCTCATGCACCCATTGGCTGACCCAGCACCGTCTTC
 AAGAACGGCGACGAGGCCGAAGACTTCGTGGAGGTCCACCTGCCAGACGTGCACGAACGCATCTCCGGAGTCGAC
 CTGGGTCTCCCCAACTGGGAAAGTACGTGTTGCTGTCTGCTGGTGGCCCTCACCGCTTTGATGCTGATCATCTTC
 TTGATGACTTGTGGAGGAGTCAACAGGTCTGAGCCTACTCAGCACAACCTGAGGGGAACCGGTAGAGAAGTG
 FCCGCTACTCCACAATCTGGAAAGATCATCAGCTCATGGGAGAGCTACAAGTCAGGGCGAGAAACCGGCTCG
 TAA

SEQ ID NO: 2

MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFIYTIIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGF
 SYMELKVGVIISAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK
 MAGDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESLVIISPVSADLDPYDRSLHSRVFPGGNCSSG
 VAVSSTYCSSTNHDTIIMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKG
 ACKLKLCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPGQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE
 ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIIPS
 KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQOHMELLVSSVPLMHPLAD
 PSTVFKNGDEAEDFVEVHLDPVHERISGVLDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTWCW
 RRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESYKSGGETGL

FIG. 5

Títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia a lo largo de diferentes días (n=5) con 0, 3, 7 regimenes de dosificación

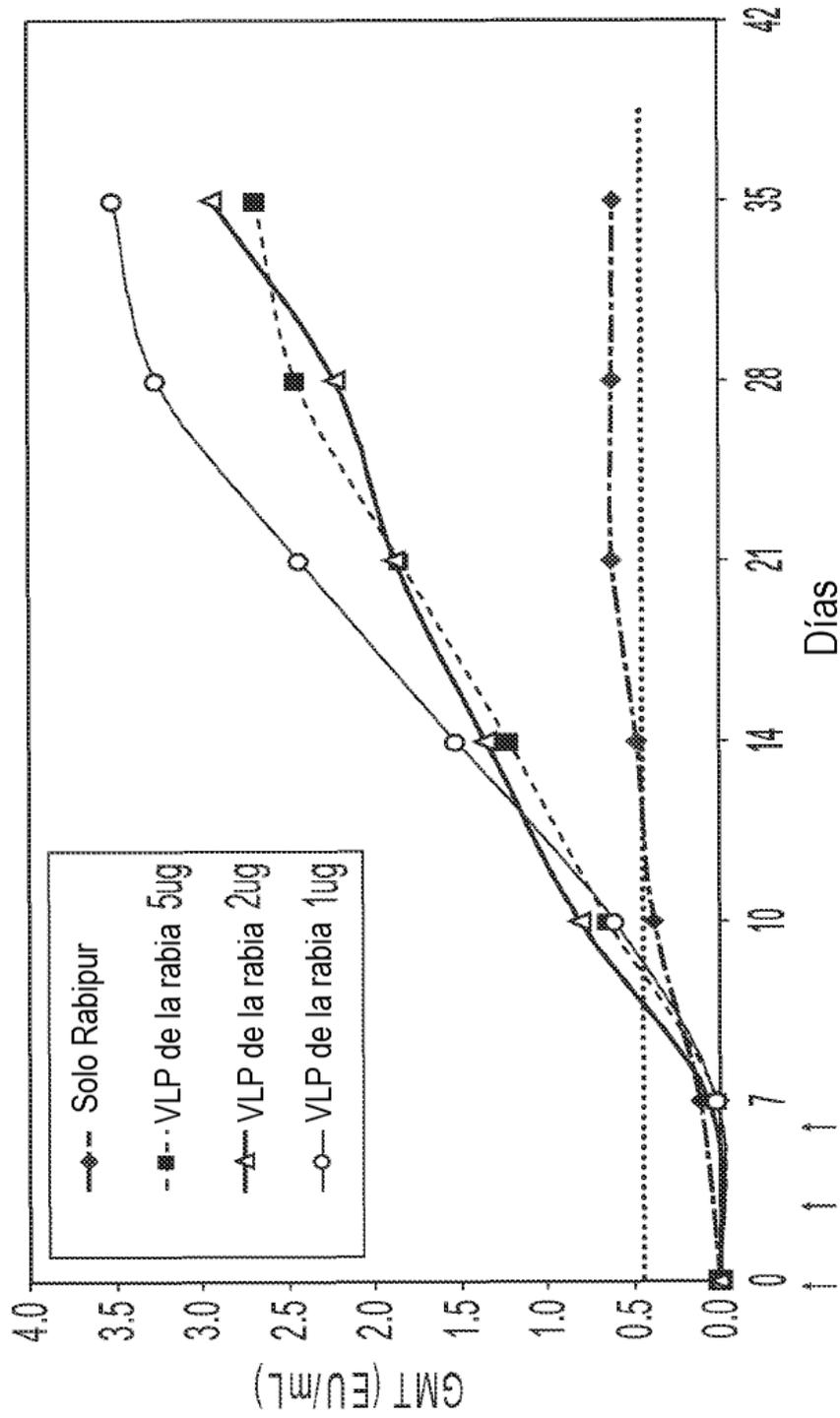


FIG. 6