

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 122**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2012 PCT/US2012/037839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12158643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 12785009 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2707025**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas de glucoproteína G de virus Hendra y Nipah**

30 Prioridad:

13.05.2011 US 201161485992 P

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

25.10.2017

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (50.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US y
HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE
ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ELHAY, MARTIN;
BRODER, CHRISTOPHER, C. y
HUANG, JIN-AN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 639 122 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas de glucoproteína G de virus Hendra y Nipah

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas y de vacuna que comprenden una glucoproteína G de virus Hendra (HeV) y/o de virus Nipah (NiV) y a métodos de uso relacionado con las mismas.

10 Descripción de los antecedentes

Los brotes recurrentes de NiV que dan como resultado números significativos de muertes humanas han sido recientemente problemáticos (véase, por ejemplo, Butler (2000) Nature 429, 7). HeV también se conoce por provocar muertes en seres humanos y animales y está genética e inmunológicamente estrechamente relacionado con NiV. En la actualidad no existen vacunas o fármacos para la prevención de la infección o de la enfermedad provocada por el virus Nipah o el virus Hendra. Tanto el virus Nipah como el virus Hendra son agentes de preocupación de biodefensa prioritaria de categoría c en el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos. Además, dado que estos virus son agentes zoonóticos de nivel 4 de bioseguridad (NBS-4), la producción de vacunas y/o diagnósticos, con seguridad es muy costosa y difícil. Por tanto, existe la necesidad de vacunas de virus Nipah o Hendra y de diagnósticos que permitan una producción de alto rendimiento de vacunas y/o diagnósticos.

Los paramixovirus tales como HeV y NiV poseen dos principales glucoproteínas de anclaje a membrana en la envoltura de la partícula vírica. Solo se requiere una proteína para la adhesión del virión a los receptores en células hospedadoras y se designa como proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) o proteína hemaglutinina (H), y la otra es glucoproteína (G), que no tiene actividades de hemaglutinación ni de neuraminidasa. Las glucoproteínas de adhesión son proteínas de membrana de tipo II, en las que el extremo amino terminal (N) de la molécula se orienta hacia el citoplasma y el extremo carboxi terminal (C) de la proteína es extracelular. La otra glucoproteína principal es la glucoproteína de fusión (F), que es una glucoproteína trimérica fusogénica de la envuelta de clase I que contiene dos regiones de repetición de héptada (HR) un péptido de fusión hidrofóbico. HeV y NiV infectan células a través de un proceso de fusión de membrana independiente de pH en células hospedadoras receptoras a través de la acción concertada de su glucoproteína G y F de adhesión tras la unión al receptor. La función primaria de la glucoproteína de adhesión G de HeV y NiV es acoplarse a los receptores apropiados en las superficies de las células hospedadoras, que para la mayoría de los paramixovirus bien caracterizados son restos de ácido siálico. Las glucoproteínas G de HeV y NiV utilizan los receptores proteicos de célula hospedadora efrina B2 y/o efrina B3 y se han desarrollado anticuerpos que bloquean la adhesión vírica mediante la glucoproteína G (WO2006137931, Bishop (2008) J. Virol. 82: 11398-11409). Además, se han desarrollado vacunas que también usan glucoproteína G como un medio para generar una respuesta inmunoprotectora frente a infección por HeV y NiV (WO2009117035). Mungall et al.(2006, J. Virol. 80(24): 12293-12302) desvelan un modelo felino de infección aguda por virus Nipah y de protección con una vacuna de subunidad basada en proteína G soluble.

La reactividad en el sitio de la dosis es una preocupación importante para el uso veterinario y humano de Quil A en las preparaciones de la vacuna. Una manera de evitar esta toxicidad de Quil A es el uso de complejos inmunoestimulantes (Rajput (2007) J. Zhejiang Univ. Sci. B, 8: 153-161). Esto es principalmente porque Quil A es menos reactivo cuando se incorpora en complejos inmunoestimulantes, porque su asociación con el colesterol en el complejo reduce su capacidad para extraer colesterol de las membranas celulares y, por tanto, sus efectos citolíticos. Además, se requiere una menor cantidad de Quil A para generar un nivel similar de efecto adyuvante. Las propiedades inmunomoduladoras de las saponinas de Quil A y los beneficios de adición que derivan de estas saponinas cuando se incorporan en un complejo inmunoestimulante se han descrito en el documento WO2000041720.

La combinación de glucoproteínas G de HeV y/o NiV con complejos inmunoestimulantes en una única vacuna supone un adelanto en el desarrollo de vacunas eficaces frente a HeV y NiV dado el potencial para una inmunorreactividad mejorada con disminución de efectos secundarios del adyuvante cuando estos componentes se administran en combinación.

55 Sumario de la invención

La invención se puede resumir mediante los siguientes párrafos numerados:

60 1. Una vacuna que comprende:

- a. un fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra, consistiendo dicho fragmento en los aminoácidos 73 a 604 de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma;
- b. un complejo inmunoestimulante (ISC, del inglés immunostimulatory complex), comprendiendo dicho ISC una saponina; un fosfolípido seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina (PC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), ácido fosfatídico (fosfatidato) (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS),

fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol fosfato (PIP), fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), fosforilcolina (SPH), fosforiletanolamina de ceramida (Cer-PE) y fosfoglicerol de ceramida; y colesterol; y
 c. uno o más excipientes;

5 para su uso en la prevención de una infección causada por virus Hendra y/o Nipah en un caballo o un cerdo, en donde dicha vacuna se administra a dicho caballo o dicho cerdo en una primera dosis y una segunda dosis, en donde cada una de dichas dosis comprende 50-100 µg de dicho fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra, consistiendo dicho fragmento en los aminoácidos 73 a 604 de la SEQ ID NO: 2 o la secuencia al menos 95 % idéntica a la misma.

10 2. La vacuna para su uso de acuerdo con el párrafo 1, en donde cada dosis comprende 100 µg de dicho fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra, consistiendo dicho fragmento en los aminoácidos 73 a 604 de la SEQ ID NO: 2 o la secuencia al menos 95 % idéntica a la misma.

15 3. La vacuna para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-2, en donde el fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 64 a 1662 de la SEQ ID NO: 16.

4. La vacuna para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-3, en donde la glucoproteína G soluble del virus Hendra está presente en forma de dímero.

20 5. La vacuna para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-4, en donde la glucoproteína G soluble del virus Hendra está presente en forma de tetrámero.

6. La vacuna para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-5, en donde cada dosis comprende 250 µg de ISC.

7. La vacuna para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-6, en donde la saponina es Quil A y el fosfolípido es DPPC.

25 8. La vacuna para su uso de acuerdo con el párrafo 7, en donde la proporción de Quil A: DPPC: Colesterol en la composición es 5:1:1 en peso.

9. La vacuna para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-8, en donde la segunda dosis se administra aproximadamente 21-28 días tras la primera dosis.

30 10. Un método para diferenciar un sujeto vacunado con la vacuna de uno cualquiera de los párrafos 1-9 de un sujeto expuesto a virus Hendra y/o Nipah que comprende detectar la presencia de un anticuerpo en una muestra biológica aislada de dicho sujeto frente a al menos una de cualquiera de las siguientes proteínas víricas de HeV y/o NiV seleccionadas del grupo que consiste en, proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la nucleocápside (N), en donde el sujeto es un caballo o un cerdo.

35 11. El método del párrafo 10, en donde el virus es un virus Hendra y el sujeto es un caballo.

12. El método del párrafo 10, en donde el virus es un virus Nipah y el sujeto es un cerdo.

La divulgación abarca una composición inmunogénica que comprende proteína G del virus Hendra y/o Nipah, un complejo inmunoestimulante (ISC) y uno o más excipientes en una cantidad eficaz para provocar la producción de anticuerpos neutralizantes frente al virus Hendra y/o Nipah tras la administración a un sujeto. En algunas realizaciones de la divulgación, la composición inmunogénica comprende una saponina, un fosfolípido y un esteroide.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, la glucoproteína G soluble del virus Hendra consiste en los aminoácidos 73 a 604 de la glucoproteína G natural (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones de la divulgación, la glucoproteína G soluble del virus Hendra está codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 64 a 1662 de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína G soluble del virus Hendra está presente en forma de dímero en donde cada subunidad de dímero de glucoproteína G soluble de virus Hendra está conectada mediante uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína G soluble del virus Hendra está presente en forma de tetrámero. En algunas realizaciones de la divulgación, la forma de tetrámero existe como un dímero de dímeros unidos de manera no covalente y/o conectados mediante uno o más enlaces disulfuro. La concentración de proteína G soluble de virus Hendra puede ser de aproximadamente 5 a 100 µg/ml en la composición inmunogénica.

55 En algunas realizaciones de la divulgación, la saponina se aísla de Quillaja saponaria Molina y se puede seleccionar de QH-A, QH-B, QH-C o QS21. En algunas realizaciones de la divulgación, el fosfolípido se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina (PC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), ácido fosfatídico (fosfatidato) (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol fosfato (PIP), fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), fosforilcolina (SPH), fosforiletanolamina de ceramida (Cer-PE) y fosforilglicerol de ceramida. En algunas realizaciones de la divulgación, la saponina es Quil A, el fosfolípido es DPPC y el esteroide es colesterol y la proporción de Quil A: DPPC: colesterol en la composición es 5:1:1 en peso.

60 La divulgación también abarca un método para producir una respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a virus Hendra y/o Nipah en un sujeto que comprende la administración al sujeto de la composición inmunogénica descrita en el presente documento en una cantidad y duración eficaz para producir la respuesta de anticuerpos neutralizantes. En algunas realizaciones de la divulgación, la respuesta de anticuerpos neutralizantes reduce la reproducción de virus Hendra y/o Nipah en el sujeto y también puede reducir el desempaquetamiento del virus

Hendra y/o Nipah en el sujeto. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto se ha expuesto a virus Hendra y/o Nipah mientras que en otras realizaciones de la divulgación, el sujeto padece una infección por virus Hendra y/o Nipah. En algunas realizaciones, la divulgación abarca un método de producción de respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a virus Hendra en un sujeto que comprende la administración al sujeto de la composición inmunogénica descrita en el presente documento en una cantidad y duración eficaz para producir la respuesta de anticuerpos neutralizantes. En algunas realizaciones, la divulgación abarca un método para producir una respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a un virus Nipah en un sujeto que comprende la administración al sujeto de la composición inmunogénica descrita en el presente documento en una cantidad y duración eficaz para producir la respuesta de anticuerpos neutralizantes.

En algunas realizaciones de la divulgación, la composición inmunogénica se administra por vía intramuscular. En algunas realizaciones de la divulgación, la composición inmunogénica se administra en múltiples dosis y la primera dosis va seguida de una segunda dosis al menos aproximadamente de veintiún días a veintiocho días tras la primera dosis. En algunas realizaciones de la divulgación, cada dosis contiene aproximadamente 50 o aproximadamente 100 µg de proteína G soluble de virus Hendra.

La divulgación además abarca un método de diferenciación de un sujeto vacunado con la composición inmunogénica descrita en el presente documento de un sujeto expuesto a virus Hendra y/o Nipah que comprende detectar la presencia de un anticuerpo en una muestra aislada del sujeto frente al menos una de cualquiera de las siguientes proteínas víricas de HeV y/o NiV seleccionadas del grupo que consiste en, proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la nucleocápside (N).

Las composiciones inmunogénicas y los métodos de la divulgación se pueden administrar a un sujeto tal como un ser humano, caballo, vaca, oveja, cerdo, cabra, pollo, perro o gato.

La divulgación también abarca un método para producir una respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a virus Hendra y/o Nipah en un sujeto humano que comprende la administración al sujeto de una composición inmunogénica que comprende una glucoproteína G soluble de virus Hendra en una cantidad y duración eficaz para producir la respuesta de anticuerpos neutralizantes. En algunas realizaciones de la divulgación, la composición inmunogénica además comprende un adyuvante.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la temperatura rectal a lo largo del tiempo de caballos administrados con glucoproteína G soluble (sG) de virus Hendra a 50 o 100 µg/dosis adyuvada con 250 µg de complejo inmunoestimulante tras la exposición a virus Hendra vivo en el día 0.

La Figura 2 muestra el ritmo cardíaco a lo largo del tiempo de caballos administrados con glucoproteína soluble (sG) de virus Hendra a 50 o 100 µg/dosis adyuvada con 250 µg de complejo inmunoestimulante tras la exposición a virus Hendra vivo en el día 0.

La Figura 3 representa un esquema de la preparación de un complejo inmunoestimulante.

La Figura 4 representa un diagrama esquemático de la pauta de vacunación con sGHeV y de exposición con NiV. Datos de la vacunación con sGHeV, la exposición con NiV y la eutanasia se indican mediante flechas. Se tomaron muestras de sangre y frotis en los días -42, -7, 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 tras la exposición tal como se indica (*). El texto en gris indica la línea temporal de la exposición (fila superior); el texto en negro indica la línea temporal de la vacunación (fila inferior). Se muestran el número de sujetos de mono verde africano (MVA) en cada grupo de dosis de vacuna y un sujeto de control.

La Figura 5 representa la curva de supervivencia de sujetos infectados por NiV. Los datos de sujetos de control (n=2) y los sujetos vacunados con sGHeV (n=9) se usaron para generar la curva de supervivencia Kaplan-Meier. El control incluyó datos de un sujeto de control histórico adicional. Los sujetos vacunados recibieron 10 µg, 50 µg o 100 µg de sGHeV administrada dos veces por vía subcutánea. El tiempo promedio hasta la etapa terminal de la enfermedad fue de 11 días en sujetos de control mientras que todos los sujetos vacunados sobrevivieron hasta la eutanasia al final del estudio.

La Figura 6 representa la inmunoglobulina (Ig) específica de NiV y de HeV en sujetos vacunados. El suero y los frotis nasales se tomaron de los sujetos vacunados y las respuestas de IgG, IgA y IgM se evaluaron usando ensayos de microsferas multiplexadas de sGHeV y sGNiV. El suero o los frotis de los sujetos en el mismo grupo de dosis de vacuna (n=3) se ensayaron de manera individual y se calculó la media de la intensidad de fluorescencia media (I.F.M.) de las microsferas que se muestra en el eje Y. Las barras de error representan el error típico de la media. La Ig específica de suero de sG se muestra en negro (sGHeV (triángulos abiertos), sGNiV (triángulos sólidos)) y la IgA de la mucosa específica de sG se muestran en símbolos grises (sGHeV (triángulos abiertos), sGNiV (triángulos sólidos)).

Descripción de la divulgación

Vacuna y composiciones inmunogénicas

5 La vacuna y la composición inmunogénica de la presente divulgación induce al menos una de una serie de respuestas inmunitarias humorales y celulares en un sujeto al que se le ha administrado la composición o es eficaz en la mejora de al menos una respuesta inmunitaria frente a al menos una cepa de HeV y/o NiV, de manera que la administración es adecuada para fines de vacuna y/o para la prevención de la infección por HeV y/o NiV por una o más cepas de HeV y/o NiV. La composición de la presente divulgación suministra al sujeto que la necesite una
10 glucoproteína G, incluyendo glucoproteínas G solubles de HeV y/o NiV y un complejo inmunoestimulante (ISC) que actúa como un adyuvante. En algunas realizaciones de la divulgación, la cantidad de glucoproteína G incluye, pero sin limitación, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 µg por ml que también puede contener 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 µg por ml de ISC. En algunas realizaciones de la divulgación, la cantidad de glucoproteína G es 5, 50 o 100 y la cantidad de ISC es 250 µg por ml.

15 A. Proteínas G de HeV y NiV

En algunas realizaciones de la divulgación, la vacuna y las composiciones inmunogénicas comprenden uno o más glucoproteínas G de HeV y/o NiV tal como se describe en el presente documento. El término proteína se usa en general en el presente documento para incluir polipéptidos o fragmentos de los mismos. A modo de ejemplo, y sin limitación, una glucoproteína G de HeV puede estar en forma soluble y comprender los aminoácidos 73-604 de la secuencia de aminoácidos para una glucoproteína G de HeV en Wang (2000) J. Virol. 74, 9972-9979 (véase también Yu (1998) Virology 251, 227-233). También a modo de ejemplo y sin limitación, una glucoproteína G de NiV puede estar en forma soluble y comprender los aminoácidos 71-602 de la secuencia de aminoácidos para una glucoproteína G de NiV en Harcourt (2000) Virology 271: 334-349, 2000 (véase también Chua (2000) Science, 288, 1432-1).

De manera general, las formas solubles de las glucoproteínas G de HeV y NiV comprenden todos o parte del ectodominio (por ejemplo, extracelular) de la glucoproteína G de un HeV o NiV y se producen de manera general por
30 delección de todo o parte del dominio transmembrana de la glucoproteína G y todo o parte de la cola citoplasmática de la glucoproteína G. A modo de ejemplo, una glucoproteína G soluble puede comprender el ectodominio completo de una glucoproteína G de HeV o NiV. También a modo de ejemplo, y sin limitación, una glucoproteína G soluble puede comprender todo o parte del ectodominio y parte del dominio transmembrana de una glucoproteína G de HeV o NiV.

Las glucoproteínas G solubles de HeV o NiV de la divulgación, conservan de manera general una o más características de la glucoproteína vírica natural, tales como, la capacidad de interactuar o unirse al receptor vírico de la célula hospedadora, se puede producir en forma oligomérica o formas, o capacidad para promover anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos neutralizantes de virus) capaces del reconocimiento de glucoproteína G natural. Ejemplos de características adicionales incluyen, pero sin limitación, la capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula hospedadora. Se puede usar la metodología convencional para evaluar glucoproteínas G solubles de HeV o NiV para una o más de las características.

A modo de ejemplo, y sin limitación, un polinucleótido que codifica una glucoproteína G soluble de HeV puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifica aproximadamente los aminoácidos 73-604 de la secuencia de aminoácidos para una glucoproteína G de HeV en Wang (2000) J. Virol. 74, 9972-9979 (SEQ ID NO: 2). También a modo de ejemplo, y sin limitación, un polinucleótido que codifica una glucoproteína G soluble de HeV puede comprender los nucleótidos 9129 a 10727 de la secuencia de polinucleótidos de una glucoproteína G de HeV en Wang (2000) J. Virol. 74, 9972-9979. Además, también se puede utilizar la secuencia de polinucleótidos optimizada por codon que codifica aproximadamente los aminoácidos 73-604 de la secuencia de aminoácidos para una glucoproteína G de HeV (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones de la divulgación, estas secuencias optimizadas por codon comprenden o consisten en los nucleótidos 64 a 1662 de la SEQ ID NO: 16. En realizaciones adicionales de la divulgación, las secuencias optimizadas por codon comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 16 que incluye los nucleótidos que codifican una secuencia líder de Igk.

A modo de ejemplo, y sin limitación, una glucoproteína G de NiV puede estar en forma soluble y comprender los aminoácidos 71-602 de la secuencia de aminoácidos para la glucoproteína G de NiV en Harcourt (2000) Virology 271, 334-349. Los ejemplos no limitantes de secuencias que se pueden usar para construir una glucoproteína G soluble de NiV se pueden encontrar en Harcourt (2000) Virology 271, 334-349. De manera general, las secuencias de glucoproteína G de cualquier aislado de virus Nipah o cepa se pueden utilizar para obtener los polinucleótidos y polipéptidos de la divulgación.

A modo de ejemplo, y sin limitación, un polinucleótido que codifica una glucoproteína G soluble de NiV puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifica aproximadamente los aminoácidos 71-602 de la secuencia de aminoácidos para una glucoproteína G de NiV en Harcourt (2000) Virology 271, 334-349. También a modo de ejemplo, y sin limitación, un polinucleótido que codifica una glucoproteína G soluble de NiV puede

comprender 234-2042 de la secuencia de polinucleótidos para una glucoproteína G de NiV en Harcourt (2000) Virology 271, 334-349 (SEQ ID NO: 4). Además, también se puede utilizar la secuencia de polinucleótidos optimizada por codon que codifica aproximadamente los aminoácidos 71-602 de la secuencia de aminoácidos para una glucoproteína G de NiV.

5 Los equivalentes funcionales de estas glucoproteínas G se pueden usar en las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la divulgación. A modo de ejemplo y sin limitación, los polipéptidos funcionalmente equivalentes poseen una o más de las siguientes características: la capacidad de interactuar o unirse al receptor vírico de la célula hospedadora, se puede producir en forma dimérica o tetramérica o formas, la capacidad para promover anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos neutralizantes de virus HeV y/o NiV) capaces de reconocer glucoproteína G natural y/o la capacidad para bloquear o prevenir la infección de una célula hospedadora.

15 En algunas realizaciones de la divulgación, la glucoproteína G puede estar en forma de dímero y/o de tetrámero. Tales dímeros dependen de la formación de enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en la glucoproteína G. Tales enlaces disulfuro pueden corresponder con los formados en la glucoproteína G natural (por ejemplo, la localización de cisteínas permanece sin cambiar) cuando se expresan en la superficie de HeV o NiV o pueden alterarse en la presencia o ubicación (por ejemplo mediante la alteración de la ubicación de cisteína(s) en la secuencia de aminoácidos) de la glucoproteína G de manera que para formar diferentes formas de dímeros y/o tetrámeros de la glucoproteína G que mejora la antigenicidad. Además, las formas no dimerizadas o tetramerizadas también están en la divulgación, teniendo en cuenta de nuevo que la glucoproteína G presenta numerosos epítomos que dependen de la conformación (es decir, que surgen de una estructura terciaria en tres dimensiones) y que la conservación de numerosos epítomos naturales de este tipo es altamente preferida para impartir una respuesta de anticuerpos neutralizantes.

25 Las composiciones inmunogénicas y de vacuna de HeV de la divulgación pueden contener proteínas de longitud variable pero incluyen los restos de aminoácidos 73 a 604 de la SEQ ID NO: 2. En una realización de la presente divulgación, las proteínas de la envoltura de la divulgación son al menos aproximadamente el 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a la glucoproteína de HeV de la SEQ ID NO: 2 (incluyendo los aminoácidos 73 a 604). Por consiguiente, las glucoproteínas G de HeV de la divulgación comprenden fragmentos inmunogénicos de la glucoproteína G de HeV con suficiente número de aminoácidos para producir epítomos conformacionales. Los ejemplos no limitantes de fragmentos inmunogénicos incluye secuencias de aminoácidos que pueden ser de al menos 530, 531, 532, 533, 534 o 535 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la divulgación, la glucoproteína G de HeV comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2 o construcciones sintéticas que comprenden adicionalmente una secuencia líder de Igk (SEQ ID NO: 15).

35 Las composiciones inmunogénicas y de vacuna de NiV de la divulgación pueden contener proteínas de longitud variable pero incluyen los restos de aminoácidos 71 a 602 de la SEQ ID NO: 4. En una realización de la presente divulgación, las proteínas de la envoltura de la divulgación son al menos aproximadamente el 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 % idénticas a la glucoproteína de NiV de la SEQ ID NO: 4 (incluyendo los aminoácidos 71 a 602). Por consiguiente, las glucoproteínas G de NiV de la divulgación comprenden fragmentos inmunogénicos de la glucoproteína G natural de NiV con un número suficiente de aminoácidos para producir epítomos conformacionales. Los ejemplos no limitantes de fragmentos inmunogénicos incluye secuencias de aminoácidos que pueden ser de al menos 528, 529, 530, 531, 532 o 533 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la divulgación, la glucoproteína G de NiV comprende o consiste en la SEQ ID NO: 4 o construcciones sintéticas que comprenden adicionalmente una secuencia líder.

50 Los fragmentos inmunogénicos tal como se describen en el presente documento contendrán al menos un epítomo del antígeno y presentan antigenicidad de HeV y/o NiV y son capaces de producir una respuesta inmunitaria cuando se presentan en una construcción adecuada, tal como por ejemplo cuando se fusionan con otros antígenos de HeV y/o NiV o se presentan en un vehículo, dirigiéndose la respuesta inmunitaria frente al antígeno natural. En una realización de la presente divulgación, los fragmentos inmunogénicos contienen al menos 20 aminoácidos contiguos del antígeno HeV y/o NiV, por ejemplo, al menos 50, 75 o 100 aminoácidos contiguos del antígeno HeV y/o NiV.

55 Las realizaciones de glucoproteína G de HeV y NiV de la divulgación incluyen adicionalmente un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con las glucoproteínas G naturales de HeV o NiV, en donde dicha secuencia de polipéptidos puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína G natural de HeV o NiV o puede incluir hasta un determinado número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína G natural de HeV o NiV, en donde dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consiste en al menos una delección de aminoácidos, una sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción, y en donde dichas alteraciones pueden darse en las posiciones de amino o carboxi terminal de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier parte entre estas posiciones terminales, intercaladas bien de manera individual entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos en la secuencia de aminoácidos de glucoproteína G natural de HeV o NiV.

65

La identidad de secuencia u homología a nivel de secuencia de aminoácidos se puede determinar mediante análisis BLAST (del inglés, Basic Local Alignment Search Tool) que usa el algoritmo empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx (Altschul (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402 y Karlin (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268) que se adaptan a la búsqueda de similitud de secuencia. La estrategia usada por el programa BLAST es considerar primer los segmentos similares, con espacios (no contiguos) y sin espacios (contiguos), entre una secuencia de consulta y una base de datos de secuencias, para evaluar después la significación estadística de todas las coincidencias que se identifican y finalmente extraer solo aquellas coincidencias que satisfacen un umbral de significación preseleccionado. Para un tratamiento de aspectos básicos en búsquedas de similitud de secuencia en bases de datos, véase Altschul (1994) Nature Genetics 6, 119-129. Los parámetros de búsqueda para histogramas, descripciones, alineamientos, esperanza (es decir, el umbral de significación estadística para comunicar coincidencias con las secuencias de la base de datos), límite, matriz y filtro (baja complejidad) están en los valores por defecto. La matriz de puntuación por defecto usada por blastp, blastx, tblastn y tblastx es la matriz BLOSUM62 (Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919), recomendado para secuencias de consulta de más de 85 aminoácidos de longitud.

La vacuna y las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente proteínas G de HeV y/o NiV de diferentes cepas que pueden potenciar adicionalmente los métodos de inmunización de la divulgación.

B. Complejos inmunoestimulantes

De manera general, la presente divulgación proporciona composiciones inmunogénicas, que incluyen composiciones de vacuna, que comprenden formas solubles de glucoproteína G de la envoltura proteica de HeV y/o NiV en combinación con un complejo inmunoestimulante (ISC) y a métodos para usar estas composiciones para la prevención y el tratamiento de infecciones por HeV y/o NiV en un sujeto. En la presente divulgación, la composición de vacuna y/o inmunogénica comprende un complejo inmunoestimulante que actúa como un adyuvante. Tal como se usa en el presente documento, "adyuvante" se refiere a un agente que, aunque no tiene ningún efecto antigénico específico por sí mismo, puede estimular el sistema inmunitario, aumentando la respuesta para un antígeno.

ISC tiene una serie de características que lo hacen un adyuvante ideal para determinadas aplicaciones:

Ahorro de antígeno: Tal como se indica por ejemplo en Wee (2008) Mucosal Immunol. 1, 489-496 en situaciones en las que la disponibilidad de antígeno es limitada o los costes del antígeno son elevados, ISC ha demostrado que permite un ahorro de antígeno de 10 a 100 veces. Muy probablemente esto es debido a una combinación de mayor eficacia o a un mecanismo de acción más apropiado comparado con otros adyuvantes.

Presentación cruzada: Tal como se indica por ejemplo en Schnurr (2009) J. Immunol. 182, 1253-1259, la presentación de antígeno por células presentadoras de antígeno (CPA) normalmente sigue una o dos vías. El antígeno externo normalmente es engullido por las CPA y posteriormente procesado y reexpresado en la superficie de CPA en el entorno de las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Entonces son detectables por los linfocitos y, si están presentes los factores/señales coestimuladores correctos, responden de manera apropiada. Los antígenos propios o de cáncer y los antígenos vírico se procesan y se expresan normalmente en el entorno de las moléculas de Clase I, ya que están presentes en el citoplasma de las CPA. La inmunidad eficaz para los antígenos de cáncer y víricos requiere el acceso a la vía de clase I. Esto tiene lugar de manera natural durante la infección vírica o la homeostasis celular (renovación celular de antígenos internos). Los antígenos (víricos o propios) introducidos como vacunas necesitan encontrar su vía desde fuera de la célula hasta la maquinaria de procesamiento de antígenos de la célula y la entrada en la ruta de clase II a la ruta de clase I. Esto puede tener lugar de manera natural en células dendríticas (CD - CPA especializadas) o se puede lograr mediante vacunas con antígenos mezclados con ISC como adyuvante. Este proceso de antígeno de procedencia externa que encuentra su vía para la ruta de Clase I de presentación de antígeno se denomina presentación cruzada. El mecanismo preciso mediante el cual ISC logra una presentación cruzada de antígeno no se ha elucidado por completo, pero puede radicar en la perturbación de membrana de los componentes de ISC.

Respuestas humoral y mediada por células: Tal como se indica, por ejemplo en Maraskovsky (2009) Immunol. Cell Biol. 87, 371-376), en virtud del mecanismo de acción de ISC tanto la parte humoral como la celular del sistema inmune adaptativo están comprometidos. En algunas especies esto es paralelo al perfil de citocinas estimuladas mediante vacuna con este adyuvante. Las respuestas inmunitarias de tipo 1 caracterizadas por la expresión de interleucina-2 y IFN-gamma y la protección frente a patógenos intracelulares (bacterias, protozoos y virus) y las respuestas de tipo 2 caracterizadas por la expresión de interleucina-4 y la generación de anticuerpos neutralizantes para la inmunidad relacionada con la antitoxina y el antipatógeno. ISC proporciona un perfil de citocinas equilibrado entre estos dos extremos, permitiendo una mayor amplitud de la respuesta inmunitaria. Además, una serie de estudios ha demostrado que ISC puede ser eficaz si las vacunas se administran por vía intranasal. Esto permite la sensibilización de las superficies mucosas y por tanto, proporciona una inmunidad relevante en el lugar de entrada del patógeno, de relevancia particular en este caso (inmunidad de la mucosa), véase también Sjölander (2001) Vaccine 19, 4072-4080.

Crterios de filtración estéril y de fabricación consistente: El tamaño de la partícula de ISC es habitualmente de 40 nm de diámetro, permitiéndola pasar a través de filtros usados para esterilizar preparaciones posteriores en la formulación. Además, se ha aprovechado la tendencia natural de las saponinas triterpenoides, tal como se encuentra en Quil A, a asociarse con colesterol y fosfolípidos en el desarrollo de métodos de fabricación para ISC. Las especies de Quil A que no forman partículas de ISC se extraen por diálisis del producto final. Controlando las proporciones de los componentes, se genera un producto consistente a partir de un espectro heterogéneo de saponinas de Quil A. Esta proporción es importante, ya que la desviación lleva a estructuras que no son las partículas características de 40 nm (hélices, láminas, etc.). La naturaleza del fluido libre del coloide ISC y su capacidad para ser medido usando microscopía electrónica de transmisión, HPLC y otras técnicas hacen que este adyuvante sea susceptible al desarrollo de ensayos de liberación y otras medidas de calidad.

Por tanto, basándose en lo anterior, en algunas realizaciones de la divulgación, la formulación de un complejo inmunoestimulante con una cantidad óptima de glucoproteína G incluye una saponina, un fosfolípido y una molécula de esteroide. En algunas realizaciones de la divulgación, la proporción molar de saponina, fosfolípido, y molécula esteroide está en una proporción 5:1:1. Un complejo inmunoestimulante puede contener, por ejemplo, del 5 al 10 % en peso de saponina, del 1 al 5 % de molécula esteroide y fosfolípido y lo restante comprendiendo glucoproteína G. La glucoproteína G se puede incorporar en el complejo inmunoestimulante bien directamente o mediante acoplamiento químico a una proteína de vehículo (por ejemplo, proteína quimérica o de fusión) tras la incorporación de complejos inmunoestimulantes. Se debería entender que la referencia a un complejo inmunoestimulante incluye la referencia a derivados, equivalentes químicos y análogos del mismo. En algunas realizaciones de la divulgación, el ISC se mezcla por separado de la glucoproteína G de HeV y/o NiV después se mezcla la glucoproteína G con el ISC. En algunas realizaciones de la divulgación, la glucoproteína G se mezcla directamente con la saponina, el fosfolípido y la molécula de esteroide.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la saponina para su uso en la presente invención puede ser Quil A y/o sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano Quillaja saponaria Molina y fue la primera que se describió como que tiene actividad adyuvante por Dalsgaard (1974) Saponin adjuvants, Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, pp. 243-254. Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC que conservan la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (EP 0362278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocido como QA7 y QA21). Q21 es una saponina natural derivada de la corteza de Quillaja saponaria Molina que induce linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), linfocitos Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante y es una saponina para uso en el contexto de la presente invención. Otras saponinas adecuadas para su uso en el ISC incluyen, pero sin limitación, las subporciones QH-A, QH-B y QH-C de Quil A, aquellas de otras especies que no sean Quillaia saponaria tales como las del género Panax (ginseng), Astragalus, Achyranthes, soja, acacia y Conodopsis. En algunas realizaciones, la saponina se aísla de una especie que no sea Quillaia saponaria.

Los ejemplos no limitantes de fosfolípidos para su uso en las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la divulgación incluyen moléculas con estructuras de diacilglicéridos y fosfoesfingolípidos. Los ejemplos no limitantes de fosfolípidos con estructuras de diacilglicéridos incluyen ácido fosfatídico (fosfatidato) (PA), fosfatidiletanolamina (cefalina) (PE), fosfatidilcolina (lecitina) (PC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o fosfatidilserina (PS). Otro ejemplo no limitante de fosfolípidos con estructuras de diacilglicérido incluye fosfoinositidas. Las fosfoinositidas ejemplares incluyen, pero sin limitación, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol fosfato (PIP), fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) o fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). Los ejemplos no limitantes de fosfoesfingolípidos incluyen, ceramida de fosforilcolina (esfingomielina) (SPH), ceramida de fosforiletanolamina (esfingomielina) (CerPE) o ceramida de fosforilglicerol.

Las moléculas esteroideas para su uso en las composiciones inmunogénicas y de vacuna de la divulgación incluyen moléculas que incorporan un esteroide como parte de su estructura. Los ejemplos no limitantes de moléculas de esteroideas incluyen colesterol, pregnenolona, 17-alfa-hidroxi-pregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenediol, progesterona, 17-alfa-hidroxi-progesterona, androstenediona, testosterona, dihidrotestosterona, desoxicorticosterona, 11-desoxicorticosterona, cortisol, corticosterona, aldosterona, estrona, estradiol o estriol.

En algunas realizaciones de la divulgación, los complejos inmunoestimulantes son típicamente, pero sin limitación, estructuras de tipo jaula pequeña de 30-40 nm de diámetro. En algunas realizaciones de la divulgación, la formulación de un complejo inmunoestimulante tiene una proporción molar de Quil A, colesterol, fosfatidilcolina y glucoproteína G en una proporción de 5:1:1. Un complejo inmunoestimulante puede contener, por ejemplo, del 5 al 10 % en peso de Quil A, del 1 al 5 % de colesterol y fosfolípidos y el resto comprendiendo glucoproteína G. La glucoproteína G se puede incorporar en el complejo inmunoestimulante bien directamente o bien mediante acoplamiento a una proteína de vehículo (por ejemplo una proteína quimérica o de fusión) tras la incorporación de proteína en los complejos inmunoestimulantes. Se debería entender que la referencia a un complejo inmunoestimulante incluye la referencia a derivados, equivalentes químicos y análogos del mismo. Por ejemplo, la referencia a un derivado de un complejo inmunoestimulante incluye la referencia a un complejo inmunoestimulante en el que uno o más de Quil A, colesterol, fosfatidilcolina o proteína, por ejemplo, se delecionan, sustituyen por, o en donde el componente en adición a Quil A, colesterol, fosfatidilcolina o proteína se añade al complejo. El equivalente funcional de un complejo inmunoestimulante puede ser un complejo inmunoestimulante en el que uno o más de sus

cuatro componentes se reemplazan con un equivalente funcional. En alguna realización de la presente divulgación, el componente de glucoproteína G del complejo inmunoestimulante se deleta. Este tipo de complejo inmunoestimulante se referencia en el presente documento como un complejo inmunoestimulante sin proteína.

5 En algunas realizaciones, la presente divulgación incluye, pero sin limitación, una composición inmunogénica que comprende una proteína G aislada de HeV o NiV capaz de inducir la producción de un antisuero neutralizante de reacción cruzada frente a múltiples cepas de HeV y/o NiV in vitro y un adyuvante que comprende Quil A, DPPC y colesterol, por ejemplo, en donde la composición contiene: 5, 50 o 100 µg de proteína G soluble de HeV o NiV y cantidades apropiadas de Quil A, DPPC y colesterol. Los ejemplos adicionales de complejos inmunoestimulantes y la preparación de los mismos, se describen en los documentos EP 0242380B1 y EP 0180564B1 y también en WO2000041720 (véase, por ejemplo, las páginas 3 y 9 de ese documento, que se refieren a: Cox & Coulter (1992) Advances in Adjuvant Technology and Application in Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology, Capítulo 4, Yong (ed.), CRC Press; Dalsgard (1974) Gesamte Virusforsch, 44, 243-254; las memorias descriptivas de patentes australianas N.º 558258, 589915, 590904 y 632067. Véase también los protocolos representativos descritos en la Patente de Estados Unidos 6.506.386 y la referencia a los mismos en el hecho bien conocido de que se pueden usar los complejos inmunoestimulantes en los que el antígeno de la proteína se incluye en el complejo inmunoestimulante cuando se forma (véase el documento EP 0109942B1), o como alternativa, se proporcionan complejos inmunoestimulantes preformados que luego se mezclan con una alícuota de antígeno añadida por separado para formar la vacuna (véase el documento EP 0436620B1). Como se reconocerá de manera general, el antígeno de la proteína también se puede unir de manera covalente al complejo inmunoestimulante (véase de nuevo el documento EP 018056481). Como también es bien reconocido en la materia, los complejos inmunoestimulantes se pueden administrar mediante una vacuna por vía mucosa (véase Mowat (1991) Immunology 72, 317-322) y los complejos inmunoestimulantes de la presente divulgación se pueden mejorar adicionalmente para la vacuna por vía mucosa mediante la inclusión de proteínas enfocadas a la membrana (WO 9730728).

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación incluye, pero sin limitación, una composición inmunogénica que comprende una proteína G aislada de HeV o NiV capaz de inducir la producción de un antisuero neutralizante de reacción cruzada frente a múltiples cepas de HeV y/o NiV in vitro y un adyuvante que comprende Quil A, DPPC y colesterol, por ejemplo, en donde la composición contiene: 5, 50 o 100 µg de proteína G soluble de HeV o NiV y cantidades apropiadas de Quil A, DPPC y colesterol. Los ejemplos adicionales de complejos inmunoestimulantes se describen en el documento WO2000041720.

30 En otra realización de la divulgación, las composiciones de vacuna e inmunogénicas pueden ser parte de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente para el suministro en el sitio de acción.

40 C. Excipientes

Las composiciones de vacuna de la invención pueden comprender adicionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes y/o estabilizantes (véase por ejemplo Remington: The Science and practice of Pharmacy (2005) Lippincott Williams), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como sal sódica de mercurio((o-carboxifenil)tio)etilo (THIOMERSAL), cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG), TWEEN o PLURONICS.

55 Las composiciones de la invención pueden estar en dosificaciones suspendidas en cualquier vehículo o excipiente farmacéutico apropiado en volumen suficiente como para transportar la dosificación. De manera general, el volumen final, incluyendo los vehículos, adyuvantes y similares, típicamente será de al menos 1,0 ml. El límite superior se rige por la viabilidad de la cantidad a administrar, de manera general, no más de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 2,0 ml.

60 Métodos de uso

La divulgación abarca métodos de prevención y/o tratamiento de infección por virus Hendra y/o Nipah que comprenden la administración de las composiciones inmunogénicas y de vacunas de la divulgación a cualquier sujeto mamífero. La inmunidad activa promovida por la vacuna con una glucoproteína G de HeV y/o NiV con los

adyuvantes descritos en el presente documento puede preparar o reforzar una respuesta inmunitaria celular o humoral. Se puede preparar una cantidad eficaz de la glucoproteína G de HeV y/o NiV o fragmentos antigénicos de la misma en una mezcla con un adyuvante para preparar una vacuna.

5 La divulgación abarca métodos de prevención y/o tratamiento de infección por virus Hendra y/o Nipah en un sujeto humano que comprende la administración de una composición inmunogénica y/o de vacuna que comprende una glucoproteína G soluble de HeV y/o NiV o combinaciones de la misma bien por sí misma o en combinación con al menos un adyuvante adecuado para su uso en seres humanos. Los adyuvantes adecuados para su uso en seres humanos se pueden usar solos o en combinación. Los ejemplos de adyuvantes adecuados para su uso en seres humanos incluyen, pero sin limitación, sales de aluminio. Los ejemplos de sales de aluminio incluyen, pero sin limitación, hidróxido de aluminio, gel de hidróxido de aluminio (Alhydrogel™), fosfato de aluminio, alumbre (sulfato de potasio y aluminio) o sales de aluminio mezcladas. Los ejemplos adicionales de adyuvantes adecuados para su uso en seres humanos incluyen, pero sin limitación, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua y AS04 (combinación de hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A) y oligodesoxinucleótidos con CpG. Los oligodesoxinucleótidos con CpG son oligonucleótidos sintéticos que contienen dinucleótidos que contienen dinucleótidos de CpG sin metilar en entornos de una secuencia particular (motivos CpG). Estos motivos CpG están presentes en una frecuencia 20 veces mayor en ADN bacteriano en comparación con el ADN de mamíferos. Los oligodesoxinucleótidos con CpG se reconocen mediante un receptor 9 de tipo Toll (TLR9) que lleva a unos fuertes efectos inmunoestimulantes.

20 La administración de una vacuna o una composición inmunogénica que comprende glucoproteína G de HeV y/o NiV con uno o más adyuvantes descritos en el presente documento, puede ser bien para fines profilácticos o bien terapéuticos. En un aspecto de la presente divulgación, la composición es útil para fines profilácticos. Cuando se proporciona de manera profiláctica, la composición de vacuna se proporciona con antelación a cualquier detección o síntoma de infección por HeV y/o NiV. La administración profiláctica de una cantidad eficaz del (los) compuesto(s) sirve para prevenir o atenuar cualquier infección por HeV y/o NiV posterior.

25 Cuando se proporciona de manera terapéutica, la vacuna se proporciona en una cantidad eficaz tras la detección de un síntoma de infección real. Se dice que una composición es "farmacológicamente aceptable" si su administración la puede tolerar el receptor. Se dice que tal composición se administra en una "cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Una composición de vacuna o inmunogénica de la presente divulgación es fisiológicamente significativa si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor, por ejemplo, mediante el aumento de una respuesta inmunitaria humoral o celular ampliamente reactiva a una o más cepas de HeV y/o NiV. La protección proporcionada no necesita ser absoluta (es decir, no se necesita que la infección por HeV o NiV sea totalmente prevenida o erradicada), siempre que haya una mejora estadísticamente significativa con respecto a una población de control. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o rapidez del inicio de los síntomas de la enfermedad.

30 Una vacuna o composición inmunogénica de la presente divulgación puede conferir resistencia a múltiples cepas de HeV y/o NiV. Tal como se usa en el presente documento, se dice que una vacuna previene o atenúa una infección si su administración a un sujeto da como resultado bien la atenuación total o parcial (es decir, supresión) de un síntoma o afección de la infección, o bien en la inmunidad total o parcial del individuo a la infección.

35 Se puede administrar al menos una composición de vacuna o inmunogénica de la presente divulgación mediante cualquier medio que logre el fin que se pretende, usando una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la administración de tal composición puede ser mediante diversas vías parenterales tales como subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica o bucal. En una realización de la presente divulgación, la composición se administra por vía subcutánea. La administración parenteral puede ser mediante inyección en bolo o mediante perfusión gradual a lo largo del tiempo.

40 Una pauta de administración típica para la prevención, la supresión o el tratamiento de una enfermedad o afección que se puede aliviar mediante una respuesta inmunitaria celular por inmunoterapia celular específica activa, comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de vacuna tal como se describe anteriormente, administrada como un único tratamiento, o repetida como dosificaciones de mejora o refuerzo, durante un período de hasta e incluyendo una semana a aproximadamente veinticuatro meses. Los ejemplos no limitantes incluyen una primera dosis seguida de una segunda dosis aproximadamente al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 días tras la primera dosis (día 0). La cantidad de la dosis de la composición inmunogénica o de vacuna puede ser menor que, la misma que o mayor que la primera dosis administrada en el día 0.

45 De acuerdo con la presente divulgación, una "cantidad eficaz" de una composición de vacuna o inmunogénica es una que es suficiente como para lograr un efecto biológico deseado, en este caso al menos una respuesta inmunitaria celular o humoral a una o más cepas de HeV y/o NiV. Se entiende que la dosificación eficaz dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del sujeto, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis efectivos proporcionados a continuación no

pretenden limitar la divulgación y representan ejemplos de intervalos de dosificación que pueden ser adecuados para administrar composiciones de la presente divulgación. No obstante, la dosificación se puede adaptar al sujeto individual, tal como se entiende y se puede determinar por un experto en la materia, sin experimentación indebida.

5 Los receptores de la vacuna y las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación, puede ser cualquier sujeto que pueda adquirir inmunidad específica a través de una respuesta inmunitaria celular o humoral para HeV y/o NiV, en donde la respuesta celular está mediada por una proteína de clase I o de clase II del MHC. Entre los mamíferos, los receptores pueden ser mamíferos del orden primates (incluyendo seres humanos, chimpancés, simios y monos). En una realización de la presente divulgación se proporciona un método para tratar seres humanos con las composiciones de vacuna o inmunogénicas de la divulgación. Los sujetos pueden estar infectados por HeV y/o NiV o proporcionar un modelo de infección por HeV o NiV como en estudios experimentales. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto es un mamífero doméstico que incluye, pero sin limitación, un caballo, vaca, buey, búfalo acuático, oveja, cerdo (Mingyi (2010) Vet. Res. 41, 33), cabra, perro (Alerta de bioseguridad - renovación del virus Hendra, 27 de julio de 2011, comunicado de prensa, Biosecurity Queensland) o gato. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto es un ave, incluyendo un pollo.

Las vacunas de la presente invención también proporcionan una protección cruzada frente a la infección por virus Nipah a dosis usadas para protegerse frente a una infección por virus Hendra y por tanto también proporciona una vacuna eficaz frente al virus Nipah.

La referencia a una respuesta inmunitaria eficaz debería entenderse como una referencia a una respuesta inmunitaria que lleva bien directamente o indirectamente a un efecto profiláctico o terapéutico beneficioso. En el caso en el que el inmunógeno comprende una glucoproteína G de HeV o NiV tal como se describe en el presente documento, tal respuesta incluye la reducción o el bloqueo de una reproducción vírica y/o el desempaquetamiento vírico y/o la reducción de los síntomas de enfermedad en un animal. Debería entenderse que la eficacia es una medida funcional y no se define solamente por la referencia al título de anticuerpo anti-HeV y/o anti-NiV ya que la presencia de anticuerpo solo en circulación no es necesariamente indicativa de la capacidad de dicho anticuerpo en circulación para bloquear la reproducción vírica y el desempaquetamiento.

También a modo de ejemplo, y sin limitación, si se está administrando un polipéptido de proteína G soluble de la divulgación para aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto infectado por o sospechoso de estar infectado por Hendra o Nipah y/o si se están administrando los anticuerpos de la presente divulgación como una forma de inmunoterapia pasiva la composición puede comprender adicionalmente, por ejemplo, otros agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes antivíricos).

El Ejemplo 4 a continuación proporciona información de determinadas composiciones preferidas para su uso en la vacunación de caballos. En relación con otros animales que pueden estar infectados por virus Hendra, y que por lo tanto requieren una vacunación para proteger tanto a los animales como a los humanos de la infección tanto por el virus Hendra como por Nipah, la siguiente información es aplicable de manera general y se puede adaptar fácilmente por los expertos en la materia. Hablando de manera general, los animales de compañía (perros y gatos) requieren aproximadamente 25 microgramos de antígeno Hendra, y pueden beneficiarse de un adyuvante de ISC en el intervalo de 25-150 microgramos, con una proporción 5:1:1 de saponina, fosfolípido y esteroles que está entre las composiciones preferidas de ISC mientras que se usa cualquiera de las especies del componente tal como se desvela en el presente documento. Para los animales de compañía es preferible que la dosis final sea de aproximadamente 1 ml. Polygen™ (MVP Technologies), un adyuvante basado en copolímeros, también se puede usar preferentemente a aproximadamente el 5-15 % (v/v).

Hablando de manera general, para animales de granja más grandes (ovejas, vacas, cerdos, etc.) las cantidades de dosis de antígeno y adyuvante (y el volumen de dosificación final) proporcionadas de otra manera en el presente documento para caballos son aplicables, esto es, se puede usar desde 50-100 microgramos de antígeno y típicamente aproximadamente 250 microgramos de ISC, en un volumen final de 1-3 ml, por ejemplo). En relación con los cerdos, una formulación alternativa y eficaz de adyuvante implica (para aproximadamente la misma cantidad de antígeno) una mezcla de ISC y polisacárido iónico, específicamente 100 mg de dextrano DEAE y 800 mg de ISC en un volumen de dosis final de 1-3 ml (de nuevo 5:1:1 de Quil A:fosfatidilcolina:colesterol (véase el documento WO 2000/41720)).

Diferenciación de animales vacunados

La invención también abarca métodos de diferenciación de animales vacunados sanos de animales expuestos a, o infectados por HeV y/o NiV. Durante la infección vírica, HeV y NiV expresan proteínas adicionales que no son glucoproteína G (G) incluyendo proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la nucleocápside (N). Estas proteínas adicionales tienen el potencial de inducir respuestas inmunitarias en animales en la forma de anticuerpos que se unen a estas proteínas o inmunidad de linfocitos T. El nivel de respuesta de anticuerpos a estas otras proteínas se puede medir normalmente mediante ensayos tales como el inmunoensayo enzimático (EIA, del inglés, enzymelinked immune assay). Las formulaciones inmunogénicas y de vacuna de la presente divulgación, en algunas realizaciones, contienen solo glucoproteína G como un antígeno de

HeV y/o NiV y, por tanto, inducirán respuestas inmunitarias con anticuerpos solo para la glucoproteína G de HeV y/o NiV. Los animales vacunados con las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento que se infectan posteriormente por HeV o NiV desencadenarán una respuesta inmunitaria de refuerzo para la glucoproteína G, pero también presentarán cambios en la presentación de anticuerpos para algunas otras proteínas de HeV y NiV que no sean la glucoproteína G. Por tanto, la presencia de anticuerpos para cualquiera de la proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la nucleocápside (N) se puede medir en un EIA para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para estas proteínas en muestras de suero. Si se detectan los anticuerpos para cualquiera de estas proteínas (es decir, otras que no sean glucoproteína G), entonces el animal ha estado expuesto a HeV y/o NiV. Como alternativa, si no se encuentran anticuerpos para estas otras proteínas y solo se detectan anticuerpos que se unen a la proteína G, entonces el animal solo se ha vacunado.

El EIA de la presente divulgación es tanto altamente específico como altamente selectivo en la detección y diferenciación entre animales infectados por HeV y/o NiV y animales sanos que se han vacunado con las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento. La presente divulgación puede utilizar una variedad de procedimientos de ensayo que incluyen ELISA tanto en ambientes homogéneos como heterogéneos. Los procedimientos de ensayo se pueden llevar a cabo en muestras tales como sangre, suero, leche u otro fluido corporal que contenga anticuerpos.

En algunas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos usados en el EIA pueden competir únicamente con anticuerpos inducidos por la vacuna con la glucoproteína G, pero no con los anticuerpos inducidos en animales por la infección con HeV y/o NiV. Esto permite no solo la diagnosis serológica de la infección por HeV y NiV, sino también la diferenciación entre la vacuna y la infección en un único ensayo. El procedimiento EIA se puede realizar en muestras de suero sanguíneo convencionales o de cualquier fluido corporal o secreción que contenga anticuerpos. El procedimiento EIA puede emplear anticuerpos monoclonales y/o policlonales para glucoproteína G y cualquier otra proteína vírica de HeV y/o NiV (por ejemplo, proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la nucleocápside (N), ya que tales proteínas no están presentes en animales sanos vacunados que no se han expuesto a HeV y/o NiV). El EIA puede llevarse a cabo en cualquier número de equipos ELISA fijos o portátiles, manuales, semi-automatizados o automatizados por robotización comercializados con o sin software y hardware de reducción de análisis de datos asistido por ordenador. En algunas realizaciones de la divulgación, los métodos de diferenciación de animales vacunados sanos de animales expuestos a, o infectados por HeV y/o NiV se puede llevar a cabo en una muestra biológica aislada de un mamífero doméstico incluyendo, pero sin limitación, un caballo, vaca, oveja, cerdo, cabra, perro o gato. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto es un ave, incluyendo un pollo. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto es un ser humano.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran solo determinadas y no todas las realizaciones de la invención y, por tanto, no deberían verse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Construcciones del vector

Los vectores se construyeron para expresar G de HeV o G de NiV con dominio transmembrana/cola citoplasmática delecionada. El ADNc clonado de la proteína G de HeV o NiV de longitud completa se amplificó mediante PCR para generar fragmentos de aproximadamente 2600 nucleótidos que codifican proteína G de HeV o NiV con dominio transmembrana/ cola citoplasmática delecionada.

Los siguientes cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron para la amplificación de G de HeV. sHGS: 5'-GTCGACCACCATGCAAAATTACACCAGAACGACTGATAAT-3' (SEQ ID NO: 5). sHGAS: 5'-GTTTAAACGTCGACCAATCAACTCTCTGAACATTG GGCAGGTATC-3'. (SEQ ID NO: 6).

Los siguientes cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron para la amplificación de G de NiV. sNGS: 5'-CTCGAGCACCATGCAAAATTACACAAGATCAACAGACAA-3' (SEQ ID NO: 7). sNGAS: 5'-CTCGAGTAGCAGCCGGATCAAGCTTATGTACATT GCTCTGGTATC-3'. (SEQ ID NO: 8).

Todas las reacciones de PCR se hicieron usando ADN polimerasa de Accupol (PGS Scientifics Corp) con los siguientes parámetros: 94 °C durante 5 minutos inicialmente y después 94 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 2 minutos, 72 °C durante 4 minutos; 25 ciclos. Estos cebadores generaron un producto de PCR para el ORF de G de sHeV flanqueado por los sitios Sal 1 y el ORF de G de sNiV flanqueado por los sitios Xho 1. Los productos de PCR se purificaron en gel (Qiagen). Tras la purificación en gel, la G de sHeV y la G de sNiV se subclonaron en un vector TOPO (Invitrogen).

Se compró Psectag2B (Invitrogen) y se modificó para que contuviese un marcador de péptido S o un marcador de epítipo myc. Se sintetizaron oligonucleótidos solapantes que codificaban la secuencia para el péptido S y se digirieron los salientes con Kpn 1 y EcoRI. SPEPS: 5'-

CAAGGAGACCGCTGCTGCTAAGTTCGAACGCCAGCACATGGATT CT-3' (SEQ ID NO: 9). SPEPAS: 5'AATTAGAATCCATGTGCTGGCGTTCGAACTT AGCAGCAGCGGTCTCCTTGGTAC-3'. (SEQ ID NO: 10).

5 Se sintetizaron oligonucleótidos solapantes que codificaban la secuencia para el epítipo myc y se digirieron los salientes con Kpn 1 y EcoRI. MTS: 5'-CGAACAAAAGCTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3' (SEQ ID NO: 11). MTAS 5'-AATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGCTTTTGTTCGGTAC-3' (SEQ ID NO: 12).

10 Se mezclaron 64 mol de SPEPS y 64 pmol de SPEPAS y se calentaron a 65 °C durante 5 minutos y se enfriaron lentamente hasta 50 °C. Se mezclaron 64 pmol de MTS y 64 pmol de MTAS y se calentaron a 65 °C durante 5 minutos y se enfriaron lentamente hasta 50 °C. Las dos mezclas se diluyeron y se clonaron en pSecTag2B digerido con Kpn1-EcoR1 para generar pSecTag2B con péptido S modificado o pSecTag2B con epítipo myc modificado. Todas las construcciones se seleccionaron inicialmente mediante digestión de restricción y se verificaron adicionalmente mediante secuenciación.

15 La construcción TOPO sG se digirió con Sal 1, se purificó en gel (Qiagen) y se subclonó en marco en el sitio Xho 1 del pSecTag2B con péptido S modificado o pSecTag2B con epítipo myc modificado. Todas las construcciones se seleccionaron inicialmente mediante digestión de restricción y se verificaron adicionalmente mediante secuenciación.

20 Las construcciones Igk líder-S-péptido-s HeVG (sG_S-marcador) y Igk líder-marcador myc -sHeVG (sG_{myc}-marcador) se subclonaron después en el vector lanzadera de vaccinia pMCO2. SEQ de oligonucleótidos: 5'-TCGACCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTA-3' (SEQ ID NO: 13) se sintetizó y se usó en combinación con el oligonucleótido sHGAS para amplificar mediante PCR el sG_S-marcador y el sG_{myc}-marcador. Todas las reacciones de PCR se hicieron usando ADN polimerasa de Accupol (PGS Scientifics Corp.) con los siguientes parámetros: 94 °C durante 5 minutos inicialmente y después 94 °C durante 1 minuto, 56 °C durante 2 minutos, 72 °C durante 4 minutos; 25 ciclos. Estos cebadores generaron productos de PCR flanqueados por los sitios de Sal 1. Los productos de PCR se purificaron en gel (Qiagen). Tras la purificación en gel, sG_S-marcador y sG_{myc}-marcador se subclonaron en un vector TOPO (Invitrogen). sG S-marcador y sG myc-marcador se digirieron con Sal 1 y se subclonaron en el sitio Sal 1 de pMCO2. Todas las construcciones se seleccionaron inicialmente mediante digestión de restricción y se verificaron adicionalmente mediante secuenciación. Se generó posteriormente una secuencia de nucleótidos optimizada con codon para facilitar la producción en líneas celulares eucariotas que se representa en la SEQ ID NO: 16.

Ejemplo 2: Producción de proteína G soluble usando Vaccinia

35 Para la producción de proteínas, las construcciones genéticas que contienen secuencias optimizadas con codon se usaron para generar vectores de poxvirus recombinantes (virus vaccinia, cepa WR). El poxvirus recombinante se obtuvo después usando técnicas convencionales que emplean selección de tk y tinción con GUS. Brevemente, las células CV-1 se transfectaron bien con la fusión pMCO2 sHeV G o con la fusión pMCO2 sNiV G usando un kit de transfección de fosfato cálcico (Promega). Estas monocapas se infectaron después con la cepa de tipo silvestre de Western Reserve (WR) del virus vaccinia a una multiplicidad de infección (MOI, del inglés multiplicity of infection) de 0,05 UFP/célula. Tras 2 días, los sedimentos de la célula se recogieron como reservas de virus recombinantes crudos. Las células TK⁻ se infectaron con la reserva cruda de recombinantes en presencia de 25 µg/ml de 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (Calbiochem). Tras 2 horas, el virus se reemplazó con un revestimiento de EMEM-10 que contiene el 1 % de agarosa de bajo punto de fusión (LMP, del inglés low melting point) y 25 µg/ml de BrdU. Tras 2 días de incubación se añadió un revestimiento adicional de EMEM-10 que contiene el 1% de agarosa LMP, 25 µg/ml de BrdU y 0,2 mg/ml de ácido 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronico (X-GLUC) (Clontech). En 24-48 horas las placas azules fueron evidentes, se tomaron y se sometieron a dos o más rondas de doble selección de la placa de purificación. Los virus vaccinia recombinantes vKB16 (fusión sHeV G) y vKB22 (fusión sNiV G) se amplificaron y purificaron después mediante métodos convencionales. Brevemente, los virus vaccinia recombinantes se purifican mediante purificación de placa, amplificación de cultivo celular, sedimentación del colchón de sacarosa en una ultracentrifugadora y titulación mediante ensayo de placa. La expresión de sHeV se verificó en lisados celulares y en sobrenadantes de cultivo.

Ejemplo 3: Producción proteica de proteína G soluble usando células 293F

55 Las construcciones genéticas que contienen las secuencias optimizadas con codon se usaron para transformar células 293F (Invitrogen) para producir una línea celular estable que expresa glucoproteína G soluble de HeV. Las células CHO-S (Invitrogen) también se pueden usar para la transformación y expresión de glucoproteína G soluble de HeV. Las células transformadas se ponen en un matraz de cultivo tisular de 162 cm² con 35 ml de DMEM-10. Se permitió que las células se adhiriesen y creciesen a 37 °C con CO₂ al 5-8 % durante varios días. Cuando las células fueron confluentes, se separaron en múltiples matraces con DMEM-10 con 150 µg/ml de Higromicina B (30 ml por matraz). Cuando las células fueron confluentes al 70-80 %, se lavaron dos veces con 30 ml de PBS, después se añadieron 20 ml de 293 SFM II (Invitrogen) y las células se incubaron toda la noche a 37 °C con CO₂ al 5-8 %. Al día siguiente, las células se transfirieron a matraces Erlenmeyer con 200 ml de medio SFM II. Se dejó que las células creciesen a 37 °C con CO₂ al 5-8 % a 125 rpm durante 5-6 días hasta que las células comenzaron a morir. En ese momento, se recogió el sobrenadante.

El medio de cada matraz Erlenmeyer se centrifugó a 3.500 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió después en botellas de centrifugación de 250 ml y se removió a 10.000 rpm durante una hora. El sobrenadante resultante se recogió y se añadió inhibidor de proteasa de acuerdo con la recomendación del fabricante junto con Triton X-100 hasta una concentración final del 0,1 %. El sobrenadante se filtró después a través de una membrana de filtro de 0,2 µm de baja unión a proteínas.

La HeVsG se purificó mediante el uso de una columna de afinidad de agarosa para proteína S. Un volumen de lecho de 20 ml de agarosa de proteína S (Novagen) se cargó en una columna XK 26 (GE Healthcare). La columna se lava con 10x volúmenes de lecho de tampón de unión/lavado (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y Triton X-100 al 0,1 %). El sobrenadante preparado de HeV sG se aplicó a la columna para mantener un caudal de 3 ml/min. La columna se lavó con 10x volúmenes de lecho (200 ml) de tampón I de unión/lavado seguido de 6x volúmenes de lecho (120 ml) de tampón de lavado 1 x tampón de lavado (NaCl 0,15 M y Tris-HCl 20 mM, pH 7,5).

Entonces se detiene la bomba y se deja que drene el tampón de lavado hasta que alcance la superficie de las perlas cuando se añaden 30 ml de tampón de elución (ácido cítrico 0,2 M, pH 2). Los primeros 10 ml de flujo a través (esto debería ser aún el tampón de lavado) se recogen y después el tampón de elución se incubaba con las perlas durante 10 minutos. A continuación, se recogen 15 ml del eluato en un tubo de centrifugación cónico estéril de 50 ml que contiene 25 ml de tampón de neutralización (Tris 1 M, pH 8). El pH se ajusta a neutro y la elución y la incubación se repiten tres veces. Todo el eluato neutralizado se combina y se concentra en aproximadamente 4 ml. La HeV sG recogida (4 ml) se purifica a través de una membrana de filtro de 0,2 µm de baja unión a proteínas (Filtro de jeringa Acrodisc de 13 mm con membrana HT Tuffryn de 0,2 µm).

Se puede utilizar la filtración en gel para purificar adicionalmente la HeV sG. Tras el análisis de control de calidad u la confirmación de pureza y del estado oligomérico, las alícuotas HeV sG agrupadas en fracciones de tetramero + dímero, dímero y monómero se almacenan a -80 °C.

Ejemplo 4: Preparación de formulación de vacuna

Un esquema que resume la preparación de ISC se expone en la Figura 3 y se describe adicionalmente a continuación.

Etapa 1: Se prepara una solución de 90 g/l de decanoil-n-metilglucamida (detergente Mega-10) se prepara en agua para inyección (WFI, del inglés Water For Injection). La solución se calienta para asegurar la disolución total de Mega 10, después se usa inmediatamente en la Etapa 2 o se filtra de forma estéril.

Etapa 2: Una solución que contiene 25 g/l de colesterol y 25 g/l de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) se prepara mediante disolución de estos componentes en la solución de reserva de detergente Mega 10. La solución se calienta para disolver todos los componentes, después se usa inmediatamente en la Etapa 3 o se filtra de forma estéril.

Etapa 3: Se prepara solución salina isotónica tamponada, tampón fosfato 10 mM a pH 6,2 ± 1 (BIS) con WFI y se filtra de forma estéril si no se usa inmediatamente.

Etapa 4: Se prepara Quil A en BIS a una concentración final de 100 g/l y se filtra de forma estéril si no se usa inmediatamente.

Etapa 5: Se formula ISC en un recipiente de agitación con temperatura controlada (22-37 °C) mediante adición secuencial de BIS precalentado, colesterol/DPPC en solución de Mega-10 (160 ml/l), y solución Quil A (200 ml/l). La reacción se lleva al volumen objetivo por adición de BIS.

Etapa 6: La solución entera se equilibra a la temperatura requerida (objetivo de 27 °C con intervalo de operación aceptable 22-37 °C) y luego se incubaba durante 15 minutos con agitación para facilitar la formación de ISC. La solución de ISC se procesa adicionalmente en la Etapa 7 o se filtra de forma estéril para almacenamiento inmediato.

Etapa 7: La mezcla de reacción ISC se lava mediante diálisis (Membrana: Hydrosart 30 kDa (Sartorius AG Goettingen)) por un mínimo de 20 intercambios de volumen frente a BIS bajo control de temperatura (objetivo de 27 °C con un intervalo de operación aceptable de 21-37°C) para retirar los componentes que no forman complejo.

Etapa 8: El ISC dializado se concentra aproximadamente 2 veces mediante ultrafiltración usando la misma membrana que se usó para la diálisis. El sistema de filtración se enjuaga con BIS para restaurar el ISC al volumen original.

Etapa 9: El ISC se transfiere a un envase de almacenamiento estéril mediante filtración estéril a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm.

Etapa 10: El adyuvante de ISC se almacena a 2-8 °C hasta su liberación para su uso en la formulación de vacuna.

La composición inmunoestimulante (250 µg/ml) se combina después con cantidades apropiadas de glucoproteína G soluble de HeV (por ejemplo, 5, 50, 100 µg/ml) y se ajusta al volumen en BIS.

Ejemplo 5: Primer experimento clínico en caballos

5 Vacuna de ensayo 1: Glucoproteína soluble (sG) de virus Hendra recombinante a 100 µg/dosis adyuvada con 250 µg de complejo inmunoestimulante; el volumen se ajusta a 1 ml/dosis con solución salina.

10 Vacuna de ensayo 2: Glucoproteína soluble (sG) de virus Hendra recombinante a 50 µg/dosis adyuvada con 250 µg de complejo inmunoestimulante; el volumen se ajusta a 1 ml/dosis con solución salina.

Vacuna de ensayo 3: Glucoproteína soluble (sG) de virus Hendra recombinante a 5 µg/dosis adyuvada con 250 µg de complejo inmunoestimulante; el volumen se ajusta a 1 ml/dosis con solución salina.

15 Se han recogido datos serológicos y de protección frente a las exposiciones de caballos de dos conjuntos de caballos a los que se les ha dado las vacunas que contienen los niveles más altos de antígeno (50 µg/dosis y 100 µg/dosis).

20 Serología: Se inmunizaron dos caballos con dos dosis de vacuna (100 µg de sG con ISC) con 21 días de diferencia. La serología posprimovacuna y preexposición confirmó la seroconversión inducida por vacuna a HeV (Tabla 1). Los niveles de anticuerpo neutralizante del virus preexposición fueron comparables con los que habían resultado ser protectores en gatos expuestos a una dosis de otro modo letal del virus estrechamente relacionado con Nipah. El caballo que recibió solo adyuvante (control negativo) no desarrolló anticuerpos para HeV antes de la exposición al virus.

25

Tabla 1

Caballo n.º	Título de partida	Título posprimovacuna	Título preexposición
V1	<2	32	1024
V2	<2	32	512
V3 (Control)	<2	<2	<2

30 Por consiguiente, cada caballo se expuso a HeV vivo en una instalación de contención de NBS4 27 días después de recibir la inmunización de refuerzo. El virus se administró por vía intranasal (DICT₅₀ de 1 x 10⁶) y por vía oral (DICT₅₀ de 1 x 10⁶). En el momento de la exposición y durante el período de observación posterior, la identidad del caballo control no fue sabida por el personal implicado en esta parte del trabajo.

35 Observaciones clínicas para V1: Este caballo permaneció clínicamente bien durante el período de observación tras la exposición a HeV aparte de una infección localizada del sitio de entrada del catéter yugular permanente observado el día 8 después de la exposición. Esto no se asoció con ningún síntoma constitucional de la enfermedad. El caballo fue electivamente eutanasiado el día 9 después de exposición vírica. Las anomalías en el examen post mortem bruto se limitaron a un lipoma mesentérico de 10 cm (hallazgo incidental) y a una ligera dilatación de los vasos linfáticos en la punta ventral del lóbulo pulmonar cardíaco izquierdo que se atribuyó a los barbituratos. En el examen inicial de los tejidos no se ha encontrado evidencia de lesiones o antígeno de HeV en este caballo.

40 Observaciones clínicas para V2: Este caballo desarrolló una secreción nasal transitoria leve en el día 3, pero luego permaneció de otro modo bien hasta un aumento de temperatura en el día 6 asociado con una reacción inflamatoria localizada en el sitio de su catéter yugular permanente. Se retiró el catéter, pero la lesión continuó aumentando y el caballo se volvió bastante irritable, de modo que al día siguiente (d 7) la yegua fue tratada con penicilina de acción prolongada. Tanto su temperatura como su temperamento habían vuelto a la normalidad en el día 8 y ella fue eutanasiada electivamente. Las anomalías en el examen post mortem bruto se limitaron a la dilatación leve de los vasos linfáticos en la punta ventral del lóbulo pulmonar cardíaco derecho que se atribuyó a los barbituratos. En el examen inicial de los tejidos no se ha encontrado evidencia de lesiones o antígeno de HeV en este caballo; El examen detallado se está completando actualmente.

50 Observaciones clínicas para V3: Este caballo desarrolló una secreción nasal transitoria leve en el día 4, pero luego permaneció de otra manera bien hasta un aumento de temperatura en el día 6 sin signos de localización. Su ritmo cardíaco también había aumentado, y tenía una ligera inclinación de la piel consistente con una deshidratación suave y una apariencia retorcida. Esta constelación de signos es típica de la infección aguda por HeV en las condiciones de laboratorio de los inventores. Su temperatura y frecuencia cardíaca continuaron aumentando durante las siguientes 12 horas (Figura 1 y 2), ella estaba ligeramente deprimida, y por lo tanto fue eutanasiada por motivos humanitarios en el día 7. En el examen post mortem hubo una dilatación moderadamente severa de los vasos linfáticos en los lóbulos cardíacos del pulmón con afectación ventral de 8-10 cm acompañada de engrosamiento pleural y edema.

55

En el examen histológico hubo vasculitis pulmonar con necrosis fibrinoide de paredes vasculares, edema de septos interlobulares y alveolitis focal necrotizante. Hubo una extensa deposición de antígeno de HeV en el endotelio y en el medio de los vasos sanguíneos en el pulmón; Meninges; Parénquima cerebral; Ganglio trigeminal; Submandibular, bronquial, inguinal y nódulos linfoides renales; bazo; hígado; corazón; paladar blando; glándula suprarrenal; Glomérulos renales; Intestinos delgado y grueso; ovario; Faringe y cornetes, así como centros germinales en el bazo y ocasionalmente miocitos cardíacos. La médula espinal, la bolsa gular, la vejiga y el bulbo olfativo del cerebro fueron negativos. La histología e inmunohistología fue consistente con infección hiperaguda por HeV.

Análisis molecular de muestras clínicas. No hubo evidencia de desempaquetamiento de HeV en ninguna muestra biológica tomada de los caballos inmunizados V1 y V2 durante el período de observación clínica. De manera específica, no se recuperó genoma de los frotis nasales profundos o de la sangre en ningún día tras la exposición.

Por el contrario, en el caballo V3 no inmunizado, se detectó genoma vírico en los frotis nasales desde el día 3 tras la exposición. Los valores de Ct en disminución en los posteriores días de muestreo sugieren la replicación vírica en las vías respiratorias superiores y es consistente con las primeras observaciones en el laboratorio de los inventores tras la exposición de los caballos no expuestos anteriormente a HeV Redlands 2008. El hallazgo de genoma vírico en la sangre inmediatamente antes de la aparición de fiebre y en todas las secreciones desde entonces, coincidiendo con el reconocimiento más temprano de otros síntomas clínicos tales como depresión es consistente con las primeras observaciones.

Tabla 2

Muestras diarias	Día de la muestra									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caballo n.º V1										
Frotis oral	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis rectal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis nasal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Orina	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Heces	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
sangre con EDTA	U	U	U	U	U	U	U	U	N/A	41,4
Caballo n.º V2										
Frotis oral	U	U	U	U	U	42,0/	U	U	U	
Frotis rectal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Frotis nasal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Orina	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
Heces	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
sangre con EDTA	U	41,7/U	U	U	U	U	U	N/A	U	
Caballo n.º V3										
Frotis oral	U	U	U	U	U	39,9/U				
Frotis rectal	U	U	U	U	U	U	U			
Frotis nasal	U	U	40,5							
Orina	U	U	U	U	U	U	42,2/U			
Heces	U	U	U	U	U	U	U	41,9/U		
sangre con EDTA	U	U	U	U	U	40,3/U				

Muestras post mortem. La PCR de TaqMan (gen N de HeV) confirmó la replicación del virus de exposición en V3 (Control) con diseminación de la infección a múltiples tejidos (Tabla 3). Los niveles más altos de replicación parecieron estar presentes en el pulmón, bazo, riñón, miocardio y tejidos linfoides asociados con las vías respiratorias superiores e inferiores tal como se ha documentado anteriormente. No hubo evidencia de replicación vírica en tejidos de caballos inmunizados (V1 y V2).

Tabla 3

Resultados de TaqMan de gen N de HeV			
Tipo de tejido	Caballo n.º V1	Caballo n.º V2	Caballo n.º V3
Adrenal	U	U	39,8/U 39,6/U U
Vejiga	U	U	
Cerebro	U	U	
LCR	U	U	[Redacted]
Bolsa gular	U	U	
Corazón de caballo	U	U	
Riñón de caballo	U	U	
Intestino grueso	U	U	
Hígado	U	U	
Pulmón	U	U	
Linfoide-bronquial	U	U	
Linfoide-cabeza	U	41,2/U	

Resultados de TaqMan de gen N de HeV			
Tipo de tejido	Caballo n.º V1	Caballo n.º V2	Caballo n.º V3
Linfoide-inguinal	U	U	[Redacted]
Linfoide-mandibular	U	U	
Linfoide-renal	U	U	
Meninges	U	U	
Corneta nasal	U	U	
Nervioso	U	U	
Olfativo	U	U	
Lóbulo	U	U	
Ovarios	41,3/U	U	
Faringe	U	U	
Intestino delgado	U	U	
Médula espinal	U	U	
Bazo	U	U	
Ganglio trigeminal	U	U	
Útero	U	U	

U= Negativo (sin amplificación)

5 Serología posexposición. Los caballos inmunizados V1 y V2 no tuvieron un refuerzo de título tras la exposición con HeV (Tabla 4). Esto es consistente con una replicación no significativa del virus de exposición en estos animales. No se detectaron anticuerpos en el caballo de control V3 en el momento de la eutanasia en el día 7 posexposición. Se considero que hubo tiempo insuficiente entre la exposición al virus y la muerte de este animal par la generación de anticuerpos detectables, y es consistente con las observaciones previas en el laboratorio de los inventores con HeV Redlands en el caballo.

10

Tabla 4

Caballo n.º	Título de partida	Título posprimovacunación	Título preexposición	Título terminal
V1	<2	32	1024	128, 128 (día 9)
V2	<2	32	512	128, 256 (día 8)
V3 (Control)	<2	<2	<2	<2, <2 (día 7)

15

Dos caballos (V1 y V2) que se vacunaron con 100 de sG + adyuvante de ISC en un régimen de primovacunación-refuerzo seroconvertido para HeV antes de la exposición a HeV. Un caballo (V3) que recibió solo ISC permaneció seronegativo a la exposición vírica.

20

Tras la exposición con una dosis de otra manera letal de HeV, los caballos inmunizados permanecieron clínicamente bien durante el período de observación, que sobrepasó el tiempo de aparición de HeV en todos los casos inducidos de manera experimental en caballos. Al caballo sin evidencia serológica de inmunidad (V3) se le practicó la eutanasia tras desarrollar signos clínicos consistentes con infección aguda por HeV. No se detectó un refuerzo en el título de anticuerpos tras la exposición en los caballos inmunizados, consistente con la no replicación del virus de exposición en estos animales.

5 No hubo evidencias de desempaquetamiento vírico en los caballos inmunizados, tal como se refleja mediante los resultados negativos del ensayo con PCR en todas las muestras clínicas diarias. En el control no inmunizado, el genoma vírico se detectó en los frotis nasales desde el día 3 tras la exposición al virus, en la sangre inmediatamente antes de la aparición de fiebre y en todas las muestras clínicas desde el momento en que se estableció la fiebre. El patrón de desempaquetamiento es consistente con el hallado en los caballos no expuestos anteriormente que se expusieron al HeV en un estudio anterior en el centro de investigación de los inventores.

10 No hubo evidencia de replicación vírica del HeV en ningún tejido de los caballos inmunizados tomado en el examen post mortem, tras la eutanasia, durante lo que se esperaba que fuese el período de infección aguda. Por el contrario, el genoma de HeV y el antígeno se distribuyeron a través de los tejidos del caballo control en un patrón consistente con la infección aguda por HeV, y también se identificó la vasculopatía típica de infección por HeV.

Ejemplo 6: Segundo ensayo clínico en caballos

15 Se inmunizaron tres caballos con dos dosis de vacuna (50 µg de sG con ISC) con 21 días de diferencia. La serología posprimovacunación y preexposición confirmó la seroconversión inducida por vacuna a HeV (Tabla 5). Los niveles de anticuerpo neutralizante del virus preexposición fueron comparables con los que habían resultado ser protectores en gatos expuestos a una dosis de otro modo letal del virus estrechamente relacionado con Nipah y a caballos expuestos a HeV en el primer ensayo clínico descrito en el presente documento. Un caballo que recibió solo adyuvante no desarrolló anticuerpos para HeV antes de la exposición vírica de los caballos inmunizados (datos no presentados).

Tabla 5

Caballo n.º	Título de partida	Título posprimovacunación	Título preexposición
V4	<2	4	256/128
V5	<2	32	2048/>8192
V6	<2	4	512/1024

25 Por consiguiente, cada caballo inmunizado se expuso a HeV vivo en una instalación de contención de NBS4 27 días después de recibir la inmunización de refuerzo. El virus se administró por vía intranasal (DICT₅₀ de 1 x 10⁶) y por vía oral (DICT₅₀ de 1 x 10⁶). Se emplearon cuatro cobayas en el presente estudio como controles de patogenicidad con la expectativa de que al menos una de ellas sucumbiría a la enfermedad de HeV. Las cobayas se expusieron a una DICT₅₀ de HeV de 50.000 por la vía intraperitoneal.

30 Observaciones clínicas para V4: Este caballo permaneció clínicamente bien durante el período de observación tras la exposición a HeV y la temperatura y la frecuencia cardíaca permanecieron dentro de los límites normales. El caballo fue electivamente eutanasiado el día 8 después de exposición vírica. No se detectaron anomalías en el examen general post mortem. En el examen inicial de los tejidos no se ha encontrado evidencia de lesiones o antígeno de HeV en este caballo; El examen detallado se está completando actualmente.

35 Observaciones clínicas para V5: Este caballo permaneció clínicamente bien durante el período de observación tras la exposición a HeV y la temperatura y la frecuencia cardíaca permanecieron dentro de los límites normales (Figura 2). El caballo fue electivamente eutanasiado el día 7 después de exposición vírica. No se detectaron anomalías en el examen general post mortem. En el examen inicial de los tejidos no se ha encontrado evidencia de lesiones o antígeno de HeV en este caballo; El examen detallado se está completando actualmente.

40 Observaciones clínicas para V6: Este caballo permaneció clínicamente bien durante el período de observación tras la exposición a HeV y la temperatura y la frecuencia cardíaca permanecieron dentro de los límites normales (Figura 2). El caballo fue electivamente eutanasiado el día 9 después de exposición vírica. No se detectaron anomalías en el examen general post mortem. En el examen inicial de los tejidos no se ha encontrado evidencia de lesiones o antígeno de HeV en este caballo; El examen detallado se está completando actualmente.

45 Cobayas: Una de las 4 cobayas (la n.º 3) comenzó a perder peso en el día 3 tras la exposición a HeV. La pérdida de peso prosiguió hasta el día 5 cuando el animal presentó síntomas neurológicos (inclinación de la cabeza, temblores) y se practicó la eutanasia. Las anomalías en el examen post mortem se limitaron al edema de los tejidos conectivos retroperitoneales.

50 En el examen histológico hubo vaculitis pulmonar, vasculitis de los vasos sanguíneos perirrenales, ooforitis y encefalitis no supurativa asociada con la deposición del antígeno de HeV. La histología e inmunohistología fueron consistentes con la infección aguda por HeV y confirmaron la patogenicidad del virus de exposición.

55 No hubo evidencias del desempaquetamiento del HeV en ninguna muestra biológica tomada de V4, V5 o V6 durante el período de observación clínica aparte de un frotis rectal de V6 en el día 3 en el que se observó un valor Ct de 36,2

mediante PCR de TaqMan en uno de los dos pocillos de réplica con el segundo pocillo sin mostrar amplificación (Tabla 6). De manera específica, no se recuperó genoma de los frotis nasales profundos o de la sangre en ningún día tras la exposición.

5 Tabla 6

Resultados de TaqMan de gen N de HeV										
Muestras diarias	Día de la muestra									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caballo n.º V4										
Frotis oral	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis rectal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis nasal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Orina	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Heces	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
sangre con EDTA	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Caballo n.º V5										
Frotis oral	U	41,9/U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis rectal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis nasal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Orina	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Heces	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
sangre con EDTA	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Caballo n.º V6										
Frotis oral	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Frotis rectal	U	U	U	36,2/U	U	U	U	U	U	U
Frotis nasal	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Orina	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Heces	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
sangre con EDTA	U	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	U
Código de colores: Negativo (sin amplificación)										
	Intermedio (Ct 40-45)									

Muestras post mortem. No hubo evidencia de replicación vírica en los tejidos de los caballos inmunizados V4, V5 o V6. En una cobaya (la n.º 3) se detectó genoma vírico en sangre (Ct 34,2), cerebro, pulmón y bazo en el día 5 tras la exposición, que corrobora los hallazgos clínicos, histológicos e inmunohistológicos de infección aguda por HeV en este animal (Tabla 7).

10

Tabla 7

Resultados de taqMan del gen N de HeV				
Tipo de tejido	Caballo n.º V4	Caballo n.º V5	Caballo n.º V6	Cobaya n.º 3
Adrenal	U	U	U	
Vejiga	U	U	U	
Cerebro	U	U	U	35,6
LCR	U	U	U	
Bolsa gular	U	U	U	
Corazón de caballo	U	U	U	
Riñón de caballo	U	U	U	
Intestino grueso	U	U	U	
Hígado	U	41,4/U	U	
Pulmón	U	U	U	33
Linfoide-bronquial	U	U	U	
Linfoide-cabeza	U	U	U	
Linfoide-inguinal	U	U	U	
Linfoide-mandibular	U	U	U	
Linfoide-renal	N/A	U	U	
Meninges	U	U	U	
Corneta nasal	U	U	U	
Nervioso	U	U	U	

Resultados de taqMan del gen N de HeV				
Tipo de tejido	Caballo n.º V4	Caballo n.º V5	Caballo n.º V6	Cobaya n.º 3
Olfativo	U	U	U	
Lóbulo	U	U	U	
Ovarios	U	U	U	
Faringe	U	U	U	
Intestino delgado	U	U	U	
Médula espinal	U	U	U	
Bazo	U	U	U	27,1
Ganglio trigeminal	U	N/A	U	
Útero	U	U	U	
	U=	Negativo	(sin amplificación)	
Código de colores:		Intermedio	(Ct 40-45)	
		Positivo		

Serología posexposición. Los caballos inmunizados V4, V5 y V6 no tuvieron un refuerzo en título tras la exposición a HeV (Tabla 8). Esto es consistente con una replicación no significativa del virus de exposición en estos animales.

Tabla 8

Caballo n.º	Título de partida	Título posprimovacunación	Título preexposición	Título terminal
V4	<2	4	256/128	256/32 (día 8)
V5	<2	32	2048/>8192	1024/512 (día 7)
V6	<2	4	512/1024	128/256 (día 9)

5 Tres caballos (V4, V5 y V6) que se vacunaron con 50 µg de sG + adyuvante de ISC en un régimen de primera vacuna-refuerzo seroconvertido a HeV antes de la exposición a HeV. Un caballo que recibió solo ISC permaneció seronegativo para la exposición al virus.

10 Tras la exposición con una dosis de otra manera letal de HeV, los caballos inmunizados permanecieron clínicamente bien durante el período de observación, que sobrepasó el tiempo de aparición de HeV en todos los casos inducidos de manera experimental en caballos. A una cobaya usada como un control de patogenicidad se le practicó la eutanasia tras desarrollar signos clínicos consistentes con infección aguda por HeV. No se detectó un refuerzo en el título de anticuerpos tras la exposición en los caballos inmunizados, consistente con la no replicación del virus de
15 exposición en estos animales.

No hubo evidencias de desempaquetamiento vírico en los caballos inmunizados, tal como se reflejó mediante los resultados negativos de ensayo de PCR en todas las muestras clínicas diarias salvo una réplica de un frotis rectal de V6 en el día 3. Este ensayo se está repitiendo; debería observarse un resultado similar, una explicación es que esto
20 representa un nivel bajo de inóculo residual. En una cobaya no inmunizada, el genoma vírico se detectó en los órganos principales y en la sangre en el día 5 tras la exposición al virus.

No hubo evidencia de replicación vírica del HeV en ningún tejido de los caballos inmunizados tomado en el examen post mortem, tras la eutanasia, durante lo que se esperaba que fuese el período de infección aguda. Por el contrario,
25 el genoma de HeV y el antígeno se distribuyeron a través de los tejidos de una cobaya susceptible en un patrón consistente con la infección aguda por HeV y también se detectó una vasculopatía típica de infección por HeV en este animal.

30 Ejemplo 7: Ensayo clínico en primates para virus Nipah

Estadísticas. La realización de estudios en animales, en particular, estudios en primates no humanos, en nivel de bioseguridad 4 (NBS4) restringe de manera severa el número de sujetos animales, el volumen de muestras biológicas que se pueden obtener y la capacidad para repetir ensayos de manera independiente y, por tanto, limitan el análisis estadístico. Por consiguiente, los datos se presentan como la media o la mediana calculada a partir de las
35 muestras replicadas, los ensayos no replicados y las barras de error representan la desviación típica de las réplicas.

Virus. Se obtuvo NiV de Malasia (n.º de registro de GenBank AF212302) de la Sección de Patógenos Especiales de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia. El NiV se propagó y se tituló en células Vero tal como se describió para HeV en Rockx y col. (2010) J. Virol. 84, 9831.

40 Formulación de la vacuna. Se emplearon tres formulaciones de sGHeV (10 µg, 50 µg o 100 µg). La producción y purificación de sGHeV se realizó tal como se describe anteriormente en Pallister (2011) Vaccine 29, 5623. Cada

formulación de vacuna también contenía Allhydrogel™ (Accurate Chemical & Scientific Corporation) y oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) 2006 (Invivogen) que contienen una estructura principal completa de fosforotioato. Se formularon dosis de vacunas que contienen cantidades fijadas de ODN 2006, cantidades variables de sGHeV e ion de aluminio (en una proporción de peso de 1:25) tal como sigue: dosis de 100 µg: 100 µg de sGHeV, 2,5 mg de ion de aluminio y 150 µg de ODN 2006; dosis de 50 µg: 50 µg de sGHeV, 1,25 mg de ion de aluminio y 150 µg de ODN 2006; y dosis de 10 µg: 5 µg de sGHeV, 250 µg de ion de aluminio y 150 µg de ODN 2006. Para todas las dosis, se mezcló primero Allhydrogel™ y sGHeV antes de que se añadiese ODN 2006. Cada dosis de vacuna se ajustó a 1 ml con PBS y las mezclas se incubaron en una rueda giratoria a temperatura ambiente durante al menos dos o tres horas antes de la inyección. Cada sujeto recibió la misma dosis de 1 ml para la primera vacuna y el refuerzo y todas las dosis de vacuna se pusieron mediante inyección intramuscular.

Animales. Diez monos verdes africanos (MVA) adultos (*Chlorocebus aethiops*), que pesaban 4-6 kg (Three Springs Scientific Inc) se enjalaron de manera individual. A los sujetos se les anestesió mediante inyección intramuscular de ketamina (10-15 mg/kg) y se vacunaron con sGHeV en el día -42 (primera vacuna) y en el día -21 (refuerzo). Tres sujetos recibieron dos dosis de 10 µg (MVA 16, MVA 17, MVA 18), tres sujetos recibieron dos dosis de 50 µg (MVA 13, MVA 14, MVA 15), tres animales recibieron dos dosis de 100 µg (MVA 10, MVA 11, MVA 12) y un sujeto (MVA 9) recibió solo adyuvante. En el día 0, se anestesió a los sujetos y se les inoculó por vía intratraqueal con un DICT₅₀ de 1×10^5 (mediana de dosis infecciosa de cultivo tisular) de NiV en 4 ml de medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich). Se anestesió a los sujetos para examen clínico incluyendo temperatura, frecuencia respiratoria, radiografías de tórax, extracción de sangre y frotis nasal, oral y de mucosa rectal en los días 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 posinfección (p.i.). Al sujeto de control (MVA 9) se le practicó la eutanasia en el día 10 tras la infección de acuerdo con los puntos finales humanos aprobados. Todos los otros sujetos sobrevivieron hasta el final del estudio y se les practicó la eutanasia en el día 28 tras la infección. Tras la necropsia, se tomaron diversos tejidos para virología e histopatología. El muestreo de tejidos incluye: conjuntiva, amígdala, oro/nasofaríngeo, mucosa nasal, tráquea, bronquio derecho, bronquio izquierdo, lóbulo superior del pulmón derecho, lóbulo medio del pulmón derecho, lóbulo inferior del pulmón derecho, lóbulo superior del pulmón izquierdo, lóbulo medio del pulmón izquierdo, lóbulo inferior del pulmón izquierdo, nódulo linfático (NL) bronquial, corazón, hígado, bazo, riñón, glándula suprarrenal, páncreas, yeyuno, colon transversal, cerebro (frontal), cerebro (cerebelo), tronco encefálico, médula espinal cervical, glándula pituitaria, NL mandibular, NL salivar, NL inguinal, NL axilar, NL mesentérico, vejiga urinaria, testículos u ovarios, médula ósea femoral. La vacunación se realizó en contención de NBS2. Una línea temporal de las pautas de vacunación, exposición y días de recogida de muestras biológicas se muestra en la Figura 4.

Vacunación y exposición a NiV. Anteriormente, los inventores han demostrado que la inoculación intratraqueal de los MVA con una DICT₅₀ de 10^5 (mediana de la dosis infecciosa de cultivo tisular) de NiV provocó un resultado letal de manera uniforme (Rockx y col. (2010) *J. Virol.* 84, 9831). En esos estudios se observó una enfermedad clínica de rápida progresión; los signos clínicos incluyeron depresión severa, enfermedad respiratoria que lleva a una dificultad respiratoria aguda, enfermedad neurológica severa y movilidad severamente reducida; y el tiempo para alcanzar los criterios humanos aprobados para la eutanasia varió de 7 a 12 días. En este punto, los inventores trataron de determinar si la vacunación con sGHeV podría prevenir la infección por NiV y la enfermedad en MVA. Las dosis de 10, 50 o 100 µg de sGHeV se mezclaron con alumbre y los restos de CpG tal como se describe en los Procedimientos. Cada formulación de vacuna se administró por vía subcutánea a tres sujetos en el día 0 (primera vacuna) y de nuevo en el día 21 (refuerzo) y un sujeto de control (MVA 9) recibió una primera vacuna y un refuerzo de solo adyuvante en los mismos días. En el día 42, todos los sujetos se inocularon por vía intratraqueal con una DICT₅₀ de 10^5 de NiV. El sujeto de control (MVA 9) presentó una pérdida de apetito, cambios severos de comportamiento sostenido (depresión, disminución de la actividad, postura encorvada), disminuciones en el número de plaquetas y un aumento gradual de la frecuencia respiratoria en la etapa final de la enfermedad. Posteriormente, el MVA 9 desarrolló una dificultad respiratoria aguda y se le tuvo que practicar la eutanasia en el día 10 de acuerdo con los puntos finales humanos aprobados. Por el contrario, ninguno de los sujetos vacunados tuvo enfermedad clínica y todos sobrevivieron hasta el final del estudio. En la Figura 5 se muestra un gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier.

Enfermedad mediada por NiV en el sujeto de control. Los cambios macroscópicos en el sujeto de control fueron consistentes con los hallados previamente en los MVA infectados por NiV (Geisbert y col. (2010) *PLoS One* 5, e10690). La esplenomegalia y la congestión de los vasos sanguíneos en la superficie del cerebro estaban presentes y todos los lóbulos pulmonares estaban húmedos y pesados. El ARN del NiV y los virus infecciosos no se recuperaron de las muestras de sangre de MVA 9 y no hubo evidencia de viremia. El MVA 9 tenía niveles significativos de IgM específica de NiV niveles detectables de IgG e IgA específicas de NiV. Los análisis adicionales de muestras de tejido revelaron un extenso tropismo tisular de NiV similar a la infección por NiV de amplia extensión vista anteriormente en los MVA (Geisbert y col. (2010) *PLoS One* 5, e10690). El MVA 9 tuvo ARN de NiV en la mayoría de los tejidos tal como se indica y el virus infeccioso se recuperó de numerosos tejidos. Las lesiones significativas incluyeron neumonía intersticial, encefalitis subaguda y necrosis y hemorragia de la pulpa blanca del bazo. Los espacios alveolares se llenaron con líquido de edema, fibrina, desechos cariográficos y celulares y macrófagos alveolares. La encefalitis multifocal se caracterizó por la expansión del espacio de Virchiw-Robins mediante números moderados de linfocitos y algunos neutrófilos. Un número menor de estas células inflamatorias se extendió hacia el parénquima adyacente. Numerosas neuronas se hincharon y se llenaron de vacuolas (degeneración) o se fragmentaron con cariólisis (necrosis). Los centros germinales multifocales de los folículos en la

pulpa blanca del bazo fueron borrados por la hemorragia y la fibrina, así como pequeños números de neutrófilos y desechos celulares y cariofrénicos. Estos hallazgos fueron consistentes con la necrosis y la pérdida de los centros germinales en el bazo. Las cantidades extensivas de antígeno vírico presentes en el tronco encefálico destacan el daño extensivo que provoca el NiV en el sistema nervioso central.

5 Protección de sujetos vacunados con sGHeV. Todas las muestras biológicas, incluyendo todas las muestras de sangre recogidas tras la exposición y todas las muestras de tejido tomadas tras la necropsia, fueron negativas en ARN de NiV y el virus infeccioso no se aisló de ninguna muestra. Tras una examinación más de cerca de las secciones de tejido de los sujetos vacunados, la estructura de los tejidos pareció ser normal y no se detectó antígeno de NiV en ningún tejido usando técnicas de inmunohistoquímica. Para diseccionar adicionalmente los mecanismos de protección promovidos por la vacuna, las IgM, IgG e IgA específicas de sGNiV y sGHeV del suero y de la mucosa, así como los títulos de neutralización sérica de NiV y HeV se midieron en los animales vacunados. Tal y como se muestra en la Figura 6, siete días antes de la exposición, los sujetos que recibieron las dosis más bajas de sGHeV tuvieron niveles detectables de IgM sérica específica de antígeno y el nivel más alto de IgG sérica específica de sGHeV. Los sujetos a los que se les dio 50 µg tuvieron niveles detectables de IgM sérica y sus niveles más altos de IgG sérica siete días antes de la exposición. Los sujetos con dosis altas no tenían IgM sérica detectable y los niveles séricos de IgG eran significativamente menores en el día -7 en comparación con los otros dos grupos. En el día de la exposición a NiV, los niveles séricos de IgG de los sujetos con dosis altas habían aumentado y todos los sujetos vacunados tenían niveles similares de IgG. Los niveles séricos de IgM no cambiaron en ningún sujeto tras la exposición a NiV. Los niveles séricos de IgG disminuyeron en los sujetos con dosis medias el día de la exposición a NiV y los niveles de IgG disminuyeron en los sujetos con dosis bajas solo tras la exposición a NiV. Curiosamente, los niveles de IgG aumentaron en ambos grupos en el día 3 y en el día 5 p.i pero nunca sobrepasaron los niveles de IgG presentes siete días antes de la exposición y en ambos grupos el título disminuyó de manera significativa en el día 28 p.i.

25 Por el contrario, los niveles séricos de IgG en el grupo de dosis alta permanecieron altos y alcanzaron su punto más alto en el día 28 p.i. La IgA sérica específica de antígeno fue detectable en todos los sujetos tras la vacunación; sin embargo, los niveles fueron muy bajos y los niveles de antes y después de la exposición no parecieron ser significativamente diferentes (Figura 6). Un aumento mínimo en la IgA de la mucosa específica de antígeno se detectó en los frotis nasales de los sujetos con dosis bajas en el día 14 p.i., sin embargo, los niveles de estos anticuerpos de la mucosa fueron tan bajos que probablemente no desempeñasen ningún papel en la prevención de la proliferación tras la exposición a NiV. Los resultados de los ensayos de neutralización sérica (SNT, del inglés serum neutralization test) se muestran en la Tabla 9. Para todos los sujetos vacunados, el título de neutralización específica de HeV permaneció igual o disminuyó hacia el día 28 p.i. y el título de neutralización específica de NiV no cambió significativamente hacia el día 7 p.i., incluso en sujetos que tuvieron el título más bajo antes de la exposición. Un sujeto de baja dosis y un sujeto de alta dosis tuvieron un aumento log en el título del SNT de NiV en el día 14 p.i. y un sujeto de dosis media tuvo un aumento log en el título del SNT de NiV en el día 21 p.i. Para todos los otros animales vacunados, los cambios en el título del SNT fueron bien inconsistentes (el título habría aumentado y después disminuido) o insignificantes (el título aumentó 3-4 veces pero no más de un log). Finalmente, se midió la seroconversión para la glucoproteína de fusión (F) de la envoltura de NiV en sujetos vacunados tras la exposición a NiV. Se detectaron niveles mínimos de IgM sérica anti-NiV en los sujetos de dosis baja y media en el día 10 y en el día 21 p.i., respectivamente, y estos valores bajos de I.F.M. sugieren una débil respuesta primaria de anticuerpos tras la exposición a NiV. La IgM sérica anti-F de NiV no se detectó en los sujetos de alta dosis, lo que sugiere que estos animales tienen poco o nada de virus en circulación tras la exposición.

45

	Día ²	-42	-7	7	14	28	-42	-7	7	14	28
dosis de sG _{HeV}	MVA	HeV				NiV					
0 µg ³	9	<20	<20	24	*	*	<20	<20	<20	*	*
10 µg	16	<20	>2560	>2560	>2560	1074	<20	379	226	>2560	2147
	17	<20	>2560	>2560	905	537	<20	134	134	537	453
	18	<20	>2560	>2560	453	537	<20	189	134	189	453
50µg	13	<20	>2560	>2560	>2560	757	<20	379	189	189	453
	14	<20	1514	>2560	>2560	537	<20	28	47	226	134
	15	<20	2147	757	>2560	905	<20	67	95	757	1074
100µg	10	<20	>2560	2147	1810	453	<20	67	113	268	453
	11	<20	>2560	>2560	>2560	1514	<20	134	189	905	1514
	12	<20	>2560	>2560	>2560	757	<20	189	226	>2560	1514

Ejemplo 8: Ensayo clínico en primates para el virus Hendra

50 Se llevó a cabo un segundo ensayo clínico en MVA para evaluar la vacunación y la exposición al virus Hendra. Se utilizó la misma formulación que se expone en el Ejemplo 7 como vacuna pero también se comparó con otro grupo que recibió sGHeV con Alhydrogel™ solo como un adyuvante (no hubo ODN 2006 presente). Los animales se

ES 2 639 122 T3

vacunaron el día -21, se reforzaron en el día 0, y se expusieron en el día 21. A menos que se indique lo contrario, todas las condiciones fueron las mismas que las del Ejemplo 7. A continuación se muestra un resumen experimental:

Grupo	Tratamiento	N	Régimen de dosificación
A	Vacuna de 100 µg/dosis de sG de Hendra + adyuvantes (150 µg de ODN 2006 con CpG + 119 µl de Alhydrogel)	4	Primera vacuna + 1 refuerzo separado por 3 semanas
B	Vacuna de 100 µg/dosis de sG de Hendra + adyuvante (250 µl de Alhydrogel)	4	Primera vacuna + 1 refuerzo separado por 3 semanas
C	Solo adyuvante (150 µg de ODN 2006 con CpG)	1	Primera vacuna + 1 refuerzo separado por 3 semanas
D	Solo adyuvante (250 µl de Alhydrogel)	1	Misma pauta que en los Grupos A-B
Total		10	

5 Resultado: Todos los animales (n=4) en ambos grupos (A y B) sobrevivieron a la exposición al virus Hendra tras ser inoculados de manera intratraqueal con una $DICT_{50}$ de 10^9 de virus Hendra. Los sujetos de control murieron el día 8. No se observó enfermedad clínica en ninguno de los sujetos vacunados y permanecieron sanos y bien hasta el último momento del estudio.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> Elhay, Martin Broder, Christopher

<120> COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE GLUCOPROTEÍNA G DE VIRUS HENDRA Y NIPAH

15

<130> 013306-5006

<160> 17

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1815

<212> ADN

<213> virus Hendra

25

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(1815)

30

<400> 1

ES 2 639 122 T3

atg atg gct gat tcc aaa ttg gta agc ctg aac aat aat cta tct ggt Met Met Ala Asp Ser Lys Leu Val Ser Leu Asn Asn Asn Leu Ser Gly 1 5 10 15	48
aaa atc aag gat caa ggt aaa gtt atc aag aat tat tac ggc aca atg Lys Ile Lys Asp Gln Gly Lys Val Ile Lys Asn Tyr Tyr Gly Thr Met 20 25 30	96
gac atc aag aaa att aac gat ggg tta tta gat agt aag ata ctt ggg Asp Ile Lys Lys Ile Asn Asp Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Gly 35 40 45	144
gcg ttt aac aca gtg ata gct ttg ttg gga tca atc atc atc att gtg Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Ile Ile Ile Val 50 55 60	192
atg aat atc atg ata att caa aat tac acc aga acg act gat aat cag Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln 65 70 75 80	240
gca cta atc aaa gag tca ctc cag agt gta cag caa caa atc aaa gct Ala Leu Ile Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala 85 90 95	288
tta aca gac aaa atc ggg aca gag ata ggc ccc aaa gtc tca cta att Leu Thr Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile 100 105 110	336
gac aca tcc agc acc atc aca att cct gct aac ata ggg tta ctg gga Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly 115 120 125	384
tcc aag ata agt cag tct acc agc agt att aat gag aat gtt aac gat Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp 130 135 140	432
aaa tgc aaa ttt act ctt cct cct tta aag att cat gag tgt aat atc Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile 145 150 155 160	480

ES 2 639 122 T3

tct tgt ccg aat cct ttg cct ttc aga gaa tac cga cca atc tca caa	528
Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln	
165 170 175	
ggg gtg agt gat ctt gta gga ctg ccg aac cag atc tgt cta cag aag	576
Gly Val Ser Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys	
180 185 190	
aca aca tca aca atc tta aag ccc agg ctg ata tcc tat act cta cca	624
Thr Thr Ser Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro	
195 200 205	
att aat acc aga gaa ggg gtt tgc atc act gac cca ctt ttg gct gtt	672
Ile Asn Thr Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val	
210 215 220	
gat aat ggc ttc ttc gcc tat agc cat ctt gaa aag atc gga tca tgt	720
Asp Asn Gly Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys	
225 230 235 240	
act aga gga att gca aaa caa agg ata ata ggg gtg ggt gag gta ttg	768
Thr Arg Gly Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu	
245 250 255	
gat agg ggt gat aag gtg cca tca atg ttt atg acc aat gtt tgg aca	816
Asp Arg Gly Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr	
260 265 270	
cca ccc aat cca agc acc atc cat cat tgc agc tca act tac cat gaa	864
Pro Pro Asn Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu	
275 280 285	
gat ttt tat tac aca ttg tgc gca gtg tcc cat gtg gga gat cct atc	912
Asp Phe Tyr Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile	
290 295 300	
ctt aac agt act tcc tgg aca gag tca ctg tct ctg att cgt ctt gct	960
Leu Asn Ser Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala	
305 310 315 320	
gta aga cca aaa agt gat agt gga gac tac aat cag aaa tac atc gct	1008
Val Arg Pro Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala	
325 330 335	
ata act aaa gtt gaa aga ggg aag tac gat aag gtg atg cct tac ggt	1056
Ile Thr Lys Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly	
340 345 350	
cca tca ggt atc aag caa ggg gat aca ttg tac ttt ccg gcc gtc ggt	1104
Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly	
355 360 365	
ttt ttg cca agg acc gaa ttt caa tat aat gac tct aat tgt ccc ata	1152
Phe Leu Pro Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile	
370 375 380	
att cat tgc aag tac agc aaa gca gaa aac tgt agg ctt tca atg ggt	1200
Ile His Cys Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly	
385 390 395 400	
gtc aac tcc aaa agt cat tat att ttg aga tca gga cta ttg aag tat	1248
Val Asn Ser Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr	

ES 2 639 122 T3

	405	410	415	
aat cta tct ctt gga gga gac atc ata ctc caa ttt atc gag att gct				1296
Asn Leu Ser Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala	420	425	430	
gac aat aga ttg acc atc ggt tct cct agt aag ata tac aat tcc cta				1344
Asp Asn Arg Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu	435	440	445	
ggt caa ccc gtt ttc tac cag gca tca tat tct tgg gat acg atg att				1392
Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile	450	455	460	
aaa tta ggc gat gtt gat acc gtt gac cct cta aga gta cag tgg aga				1440
Lys Leu Gly Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg	465	470	475	480
aat aac agt gtg att tct aga cct gga cag tca cag tgt cct cga ttt				1488
Asn Asn Ser Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe	485	490	495	
aat gtc tgt ccc gag gta tgc tgg gaa ggg aca tat aat gat gct ttt				1536
Asn Val Cys Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe	500	505	510	
cta ata gac cgg cta aac tgg gtt agt gct ggt gtt tat tta aac agt				1584
Leu Ile Asp Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser	515	520	525	
aac caa act gca gag aac cct gtg ttt gcc gta ttc aag gat aac gag				1632
Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu	530	535	540	
atc ctt tac caa gtt cca ctg gct gaa gat gac aca aat gca caa aaa				1680
Ile Leu Tyr Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys	545	550	555	560
acc atc aca gat tgc ttc ttg ctg gag aat gtc ata tgg tgt ata tca				1728
Thr Ile Thr Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser	565	570	575	
cta gta gaa ata tac gat aca gga gac agt gtg ata agg cca aaa cta				1776
Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu	580	585	590	
ttt gca gtc aag ata cct gcc caa tgt tca gag agt tga				1815
Phe Ala Val Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser	595	600		

<210>2
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> virus Hendra

5

<400> 2

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

Lys Ile Lys Asp Gln Gly Lys Val Ile Lys Asn Tyr Tyr Gly Thr Met

ES 2 639 122 T3

Pro Pro Asn Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu
 275 280 285

Asp Phe Tyr Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile
 290 295 300

Leu Asn Ser Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala
 305 310 315 320

Val Arg Pro Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala
 325 330 335

Ile Thr Lys Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly
 340 345 350

Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly
 355 360 365

Phe Leu Pro Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile
 370 375 380

Ile His Cys Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly
 385 390 395 400

Val Asn Ser Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr
 405 410 415

Asn Leu Ser Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala
 420 425 430

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

Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile
 450 455 460

Lys Leu Gly Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg
 465 470 475 480

Asn Asn Ser Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe
 485 490 495

Asn Val Cys Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe
 500 505 510

Leu Ile Asp Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser
 515 520 525

ES 2 639 122 T3

Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu
 530 535 540

Ile Leu Tyr Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys
 545 550 555 560

Thr Ile Thr Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser
 565 570 575

Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu
 580 585 590

Phe Ala Val Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 595 600

<210>3
 <211> 1809
 <212> ADN
 <213> virus Nipah

5

<220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(1809)

10

<400>3

atg ccg gca gaa aac aag aaa gtt aga ttc gaa aat act act tca gac	48
Met Pro Ala Glu Asn Lys Lys Val Arg Phe Glu Asn Thr Thr Ser Asp	
1 5 10 15	
aaa ggg aaa att cct agt aaa gtt att aag agc tac tac gga acc atg	96
Lys Gly Lys Ile Pro Ser Lys Val Ile Lys Ser Tyr Tyr Gly Thr Met	
20 25 30	
gac att aag aaa ata aat gaa gga tta ttg gac agc aaa ata tta agt	144
Asp Ile Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser	
35 40 45	
gct ttc aac aca gta ata gca ttg ctt gga tct atc gtg atc ata gtg	192
Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val	
50 55 60	
atg aat ata atg atc atc caa aat tac aca aga tca aca gac aat cag	240
Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln	
65 70 75 80	
gcc gtg atc aaa gat gcg ttg cag ggt atc caa cag cag atc aaa ggg	288
Ala Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly	
85 90 95	
ctt gct gac aaa atc ggc aca gag ata ggg ccc aaa gta tca ctg att	336
Leu Ala Asp Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile	
100 105 110	
gac aca tcc agt acc att act atc cca gct aac att ggg ctg tta ggt	384
Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly	
115 120 125	

ES 2 639 122 T3

tca aag atc agc cag tcg act gca agt ata aat gag aat gtg aat gaa Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu 130 135 140	432
aaa tgc aaa ttc aca ctg cct ccc ttg aaa atc cac gaa tgt aac att Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile 145 150 155 160	480
tct tgt cct aac cca ctc cct ttt aga gag tat agg cca cag aca gaa Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu 165 170 175	528
ggg gtg agc aat cta gta gga tta cct aat aat att tgc ctg caa aag Gly Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys 180 185 190	576
aca tct aat cag ata ttg aag cca aag ctg att tca tac act tta ccc Thr Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro 195 200 205	624
gta gtc ggt caa agt ggt acc tgt atc aca gac cca ttg ctg gct atg Val Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met 210 215 220	672
gac gag ggc tat ttt gca tat agc cac ctg gaa aga atc gga tca tgt Asp Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys 225 230 235 240	720
tca aga ggg gtc tcc aaa caa aga ata ata gga gtt gga gag gta cta Ser Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu 245 250 255	768
gac aga ggt gat gaa gtt cct tct tta ttt atg acc aat gtc tgg acc Asp Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr 260 265 270	816
cca cca aat cca aac acc gtt tac cac tgt agt gct gta tac aac aat Pro Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn 275 280 285	864
gaa ttc tat tat gta ctt tgt gca gtg tca act gtt gga gac cct att Glu Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile 290 295 300	912
ctg aat agc acc tac tgg tcc gga tct cta atg atg acc cgt cta gct Leu Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala 305 310 315 320	960
gtg aaa ccc aag agt aat ggt ggg ggt tac aat caa cat caa ctt gcc Val Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala 325 330 335	1008
cta cga agt atc gag aaa ggg agg tat gat aaa gtt atg ccg tat gga Leu Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly 340 345 350	1056
cct tca ggc atc aaa cag ggt gac acc ctg tat ttt cct gct gta gga Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly 355 360 365	1104
ttt ttg gtc agg aca gag ttt aaa tac aat gat tca aat tgt ccc atc Phe Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile	1152

ES 2 639 122 T3

370	375	380	
acg aag tgt caa tac agt aaa cct gaa aat tgc agg cta tct atg ggg			1200
Thr Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly			
385	390	395	400
att aga cca aac agc cat tat atc ctt cga tct gga cta tta aaa tac			1248
Ile Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr			
	405	410	415
aat cta tca gat ggg gag aac ccc aaa gtt gta ttc att gaa ata tct			1296
Asn Leu Ser Asp Gly Glu Asn Pro Lys Val Val Phe Ile Glu Ile Ser			
	420	425	430
gat caa aga tta tct att gga tct cct agc aaa atc tat gat tct ttg			1344
Asp Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu			
	435	440	445
ggt caa cct gtt ttc tac caa gcg tca ttt tca tgg gat act atg att			1392
Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile			
	450	455	460
aaa ttt gga gat gtt cta aca gtc aac cct ctg gtt gtc aat tgg cgt			1440
Lys Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg			
	465	470	475
aat aac acg gta ata tca aga ccc ggg caa tca caa tgc cct aga ttc			1488
Asn Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe			
	485	490	495
aat aca tgt cca gag atc tgc tgg gaa gga gtt tat aat gat gca ttc			1536
Asn Thr Cys Pro Glu Ile Cys Trp Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe			
	500	505	510
cta att gac aga atc aat tgg ata agc gcg ggt gta ttc ctt gac agc			1584
Leu Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser			
	515	520	525
aat cag acc gca gaa aat cct gtt ttt act gta ttc aaa gat aat gaa			1632
Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu			
	530	535	540
ata ctt tat agg gca caa ctg gct tct gag gac acc aat gca caa aaa			1680
Ile Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys			
	545	550	555
aca ata act aat tgt ttt ctc ttg aag aat aag att tgg tgc ata tca			1728
Thr Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser			
	565	570	575
ttg gtt gag ata tat gac aca gga gac aat gtc ata aga ccc aaa cta			1776
Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu			
	580	585	590
ttc gcg gtt aag ata cca gag caa tgt aca taa			1809
Phe Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr			
	595	600	

<210>4
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> virus Nipah
 <400> 4

ES 2 639 122 T3

Met Pro Ala Glu Asn Lys Lys Val Arg Phe Glu Asn Thr Thr Ser Asp
 1 5 10 15

Lys Gly Lys Ile Pro Ser Lys Val Ile Lys Ser Tyr Tyr Gly Thr Met
 20 25 30

Asp Ile Lys Lys Ile Asn Glu Gly Leu Leu Asp Ser Lys Ile Leu Ser
 35 40 45

Ala Phe Asn Thr Val Ile Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Ile Ile Val
 50 55 60

Met Asn Ile Met Ile Ile Gln Asn Tyr Thr Arg Ser Thr Asp Asn Gln
 65 70 75 80

Ala Val Ile Lys Asp Ala Leu Gln Gly Ile Gln Gln Gln Ile Lys Gly
 85 90 95

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

Asp Thr Ser Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly
 115 120 125

Ser Lys Ile Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Glu
 130 135 140

Lys Cys Lys Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile
 145 150 155 160

Ser Cys Pro Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Gln Thr Glu
 165 170 175

Gly Val Ser Asn Leu Val Gly Leu Pro Asn Asn Ile Cys Leu Gln Lys
 180 185 190

Thr Ser Asn Gln Ile Leu Lys Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro
 195 200 205

Val Val Gly Gln Ser Gly Thr Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Met
 210 215 220

Asp Glu Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Arg Ile Gly Ser Cys
 225 230 235 240

ES 2 639 122 T3

Ser Arg Gly Val Ser Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu
245 250 255

Asp Arg Gly Asp Glu Val Pro Ser Leu Phe Met Thr Asn Val Trp Thr
260 265 270

Pro Pro Asn Pro Asn Thr Val Tyr His Cys Ser Ala Val Tyr Asn Asn
275 280 285

Glu Phe Tyr Tyr Val Leu Cys Ala Val Ser Thr Val Gly Asp Pro Ile
290 295 300

Leu Asn Ser Thr Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Met Met Thr Arg Leu Ala
305 310 315 320

Val Lys Pro Lys Ser Asn Gly Gly Gly Tyr Asn Gln His Gln Leu Ala
325 330 335

Leu Arg Ser Ile Glu Lys Gly Arg Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly
340 345 350

Pro Ser Gly Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly
355 360 365

Phe Leu Val Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile
370 375 380

Thr Lys Cys Gln Tyr Ser Lys Pro Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly
385 390 395 400

Ile Arg Pro Asn Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr
405 410 415

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

Asp Gln Arg Leu Ser Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asp Ser Leu
435 440 445

Gly Gln Pro Val Phe Tyr Gln Ala Ser Phe Ser Trp Asp Thr Met Ile
450 455 460

Lys Phe Gly Asp Val Leu Thr Val Asn Pro Leu Val Val Asn Trp Arg
465 470 475 480

Asn Asn Thr Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe
485 490 495

ES 2 639 122 T3

Asn Thr Cys Pro Glu Ile Cys Trp Glu Gly Val Tyr Asn Asp Ala Phe
500 505 510

Leu Ile Asp Arg Ile Asn Trp Ile Ser Ala Gly Val Phe Leu Asp Ser
515 520 525

Asn Gln Thr Ala Glu Asn Pro Val Phe Thr Val Phe Lys Asp Asn Glu
530 535 540

Ile Leu Tyr Arg Ala Gln Leu Ala Ser Glu Asp Thr Asn Ala Gln Lys
545 550 555 560

Thr Ile Thr Asn Cys Phe Leu Leu Lys Asn Lys Ile Trp Cys Ile Ser
565 570 575

Leu Val Glu Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Asn Val Ile Arg Pro Lys Leu
580 585 590

Phe Ala Val Lys Ile Pro Glu Gln Cys Thr
595 600

5 <210>5
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 5
gtcgaccacc atgcaaaatt acaccagaac gactgataat 40

15 <210>6
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 6
gtttaaacgt cgaccaatca actctctgaa cattgggcag gtatc 45

25 <210>7
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 7
ctcgagcacc atgcaaaatt acacaagatc aacagacaa 39

35 <210>8
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

ES 2 639 122 T3

	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 8 ctcgagtagc agccggatca agcttatgta cattgctctg gtatc	45
10	<210>9 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 9 caaggagacc gctgctgcta agttcgaacg ccagcacatg gattct	46
20	<210> 10 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 10 aattagaatc catgtgctgg cgttcgaact tagcagcagc ggtctccttg gtac	54
30	<210> 11 <211>31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 11 cgaacaaaag ctcatctcag aagaggatct g	31
40	<210> 12 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 12 aattcagatc ctctctgag atgagctttt gttcggtac	39
55	<210> 13 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<400> 13 tcgaccacc atggagacag acacactcct gcta	34
65	<210> 14 <211> 1662 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 639 122 T3

<220>
 <223> Secuencia vírica de sG de HeV

5 <220>
 <221 > CDS
 <222> (1)..(1662)

<400> 14

atg gaa acc gac acc ctg ctg ctg tgg gtg ctg ctc ctg tgg gtc ccc 48
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

ggc agc aca ggc gac tac acc aga acg act gat aat cag gca cta atc 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln Ala Leu Ile
 20 25 30

aaa gag tca ctc cag agt gta cag caa caa atc aaa gct tta aca gac 144
 Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp
 35 40 45

aaa atc ggg aca gag ata ggc ccc aaa gtc tca cta att gac aca tcc 192
 Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp Thr Ser
 50 55 60

agc acc atc aca att cct gct aac ata ggg tta ctg gga tcc aag ata 240
 Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser Lys Ile
 65 70 75 80

agt cag tct acc agc agt att aat gag aat gtt aac gat aaa tgc aaa 288
 Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp Lys Cys Lys
 85 90 95

ttt act ctt cct cct tta aag att cat gag tgt aat atc tct tgt ccg 336
 Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser Cys Pro
 100 105 110

aat cct ttg cct ttc aga gaa tac cga cca atc tca caa ggg gtg agt 384
 Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln Gly Val Ser
 115 120 125

gat ctt gta gga ctg ccg aac cag atc tgt cta cag aag aca aca tca 432
 Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys Thr Thr Ser
 130 135 140

10 aca atc tta aag ccc agg ctg ata tcc tat act cta cca att aat acc 480
 Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Thr

ES 2 639 122 T3

Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly
 405 410 415

gat gtt gat acc gtt gac cct cta aga gta cag tgg aga aat aac agt 1296
 Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser
 420 425 430

gtg att tct aga cct gga cag tca cag tgt cct cga ttt aat gtc tgt 1344
 Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys
 435 440 445

ccc gag gta tgc tgg gaa ggg aca tat aat gat gct ttt cta ata gac 1392
 Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460

cgg cta aac tgg gtt agt gct ggt gtt tat tta aac agt aac caa act 1440
 Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480

gca gag aac cct gtg ttt gcc gta ttc aag gat aac gag atc ctt tac 1488
 Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495

caa gtt cca ctg gct gaa gat gac aca aat gca caa aaa acc atc aca 1536
 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

gat tgc ttc ttg ctg gag aat gtc ata tgg tgt ata tca cta gta gaa 1584
 Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525

ata tac gat aca gga gac agt gtg ata agg cca aaa cta ttt gca gtc 1632
 Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540

aag ata cct gcc caa tgt tca gag agt tga 1662
 Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

<210> 15
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

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

Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp
 35 40 45

Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp Thr Ser

ES 2 639 122 T3

50																			
Ser	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Lys	Ile				
65					70					75					80				
Ser	Gln	Ser	Thr	Ser	Ser	Ile	Asn	Glu	Asn	Val	Asn	Asp	Lys	Cys	Lys				
				85					90					95					
Phe	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Ile	His	Glu	Cys	Asn	Ile	Ser	Cys	Pro				
			100					105					110						
Asn	Pro	Leu	Pro	Phe	Arg	Glu	Tyr	Arg	Pro	Ile	Ser	Gln	Gly	Val	Ser				
		115					120					125							
Asp	Leu	Val	Gly	Leu	Pro	Asn	Gln	Ile	Cys	Leu	Gln	Lys	Thr	Thr	Ser				
	130					135					140								
Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Arg	Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Leu	Pro	Ile	Asn	Thr				
145					150					155					160				
Arg	Glu	Gly	Val	Cys	Ile	Thr	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Val	Asp	Asn	Gly				
				165					170					175					
Phe	Phe	Ala	Tyr	Ser	His	Leu	Glu	Lys	Ile	Gly	Ser	Cys	Thr	Arg	Gly				
			180					185					190						
Ile	Ala	Lys	Gln	Arg	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Glu	Val	Leu	Asp	Arg	Gly				
		195					200					205							
Asp	Lys	Val	Pro	Ser	Met	Phe	Met	Thr	Asn	Val	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn				
	210					215					220								
Pro	Ser	Thr	Ile	His	His	Cys	Ser	Ser	Thr	Tyr	His	Glu	Asp	Phe	Tyr				
225					230					235				240					
Tyr	Thr	Leu	Cys	Ala	Val	Ser	His	Val	Gly	Asp	Pro	Ile	Leu	Asn	Ser				
				245					250					255					
Thr	Ser	Trp	Thr	Glu	Ser	Leu	Ser	Leu	Ile	Arg	Leu	Ala	Val	Arg	Pro				
			260					265					270						
Lys	Ser	Asp	Ser	Gly	Asp	Tyr	Asn	Gln	Lys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Thr	Lys				
		275					280					285							
Val	Glu	Arg	Gly	Lys	Tyr	Asp	Lys	Val	Met	Pro	Tyr	Gly	Pro	Ser	Gly				
	290					295					300								

ES 2 639 122 T3

Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro
 305 310 315 320

Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys
 325 330 335

Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser
 340 345 350

Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser
 355 360 365

Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg
 370 375 380

Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly
 405 410 415

Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser
 420 425 430

Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys
 435 440 445

Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460

Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480

Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495

Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525

Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540

Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

<210> 16
 <211> 1662
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sG de virus Hendra en mamífero optimizada con codon

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1662)

10

<400> 16

ES 2 639 122 T3

atg gaa acc gac acc ctg ctg ctg tgg gtg ctg ctc ctg tgg gtc ccc	48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	
ggc agc aca ggc gac tac acc cgg acc acc gac aac cag gcc ctg atc	96
Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Thr Arg Thr Thr Asp Asn Gln Ala Leu Ile	
20 25 30	
aaa gag tcc ctg cag agc gtc cag cag cag atc aag gcc ctg acc gac	144
Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp	
35 40 45	
aag atc ggc acc gag atc ggc ccc aaa gtg tcc ctg atc gac acc agc	192
Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp Thr Ser	
50 55 60	
agc acc atc acc atc ccc gcc aac atc ggg ctg ctg gcc tcc aag atc	240
Ser Thr Ile Thr Ile Pro Ala Asn Ile Gly Leu Leu Gly Ser Lys Ile	
65 70 75 80	
agc cag agc acc agc tcc atc aac gag aac gtg aac gac aag tgc aag	288
Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp Lys Cys Lys	
85 90 95	
ttc acc ctg ccc ccc ctg aag atc cac gag tgc aac atc agc tgc ccc	336
Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser Cys Pro	
100 105 110	
aac ccc ctg ccc ttc cgg gag tac cgg ccc atc agc cag gcc gtg agc	384
Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln Gly Val Ser	
115 120 125	
gac ctg gtg ggc ctg ccc aac cag atc tgc ctg cag aaa acc acc tcc	432
Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys Thr Thr Ser	
130 135 140	
acc atc ctg aag ccc cgg ctg atc agc tac acc ctg ccc atc aac acc	480
Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Thr	
145 150 155 160	
cgg gag ggc gtg tgc atc acc gac cct ctg ctg gcc gtg gac aac gcc	528
Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val Asp Asn Gly	
165 170 175	
ttc ttc gcc tac agc cac ctg gaa aag atc ggc agc tgc acc cgg gcc	576
Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys Thr Arg Gly	
180 185 190	

ES 2 639 122 T3

att gcc aag cag cgg atc atc ggc gtg ggc gag gtg ctg gac cgg ggc Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp Arg Gly 195 200 205	624
gac aag gtg ccc agc atg ttc atg acc aac gtg tgg acc ccc ccc aac Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro Pro Asn 210 215 220	672
ccc agc aca atc cac cac tgc agc agc acc tac cac gag gac ttc tac Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu Asp Phe Tyr 225 230 235 240	720
tac acc ctg tgc gcc gtg agc cac gtg ggc gac ccc atc ctg aac agc Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile Leu Asn Ser 245 250 255	768
acc agc tgg acc gag agc ctg agc ctg atc cgg ctg gcc gtg cgg ccc Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala Val Arg Pro 260 265 270	816
aag agc gac agc ggc gac tac aac cag aag tat atc gcc atc acc aag Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala Ile Thr Lys 275 280 285	864
gtg gag cgg ggc aag tac gac aaa gtg atg ccc tac gcc ccc agc ggc Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro Ser Gly 290 295 300	912
atc aag cag ggc gac aca ctg tac ttc ccc gcc gtg ggc ttc ctg ccc Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro 305 310 315 320	960
cgg acc gag ttc cag tac aac gac agc aac tgc ccc atc atc cac tgc Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys 325 330 335	1008
aag tac agc aag gcc gag aac tgc aga ctg agc atg ggc gtg aac agc Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser 340 345 350	1056
aag agc cac tac atc ctg cgg agc ggc ctg ctg aag tac aac ctg tcc Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser 355 360 365	1104
ctg ggc ggc gac atc atc ctg cag ttc atc gag atc gcc gac aac cgg Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg 370 375 380	1152
ctg acc atc ggc agc ccc agc aag atc tac aac agc ctg ggc cag ccc Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro 385 390 395 400	1200
gtg ttc tac cag gcc agc tac agc tgg gac acc atg atc aag ctg ggg Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly 405 410 415	1248
gac gtg gac acc gtg gac ccc ctg cgg gtg cag tgg cgg aac aac agc Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser 420 425 430	1296
gtg atc agc aga ccc ggc cag agc cag tgc ccc cgg ttc aac gtg tgc Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys 435 440 445	1344

ES 2 639 122 T3

ccc gaa gtg tgc tgg gag ggc acc tac aac gac gcc ttt ctg atc gac 1392
 Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460

cgg ctg aac tgg gtg tcc gcc gga gtg tac ctg aac tcc aac cag acc 1440
 Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480

gcc gag aac ccc gtg ttc gcc gtg ttc aag gac aac gag atc ctg tac 1488
 Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495

cag gtg ccc ctg gcc gag gac gac acc aac gcc cag aaa acc atc acc 1536
 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

gac tgc ttt ctg ctg gaa aac gtg atc tgg tgc atc agc ctg gtg gag 1584
 Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525

atc tac gac acc ggc gac tcc gtg atc cgg ccc aag ctg ttt gcc gtg 1632
 Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540

aag atc ccc gcc cag tgc agc gag agc tga 1662
 Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

<210> 17
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

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

Lys Glu Ser Leu Gln Ser Val Gln Gln Gln Ile Lys Ala Leu Thr Asp
 35 40 45

Lys Ile Gly Thr Glu Ile Gly Pro Lys Val Ser Leu Ile Asp Thr Ser
 50 55 60

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

Ser Gln Ser Thr Ser Ser Ile Asn Glu Asn Val Asn Asp Lys Cys Lys
 85 90 95

ES 2 639 122 T3

Phe Thr Leu Pro Pro Leu Lys Ile His Glu Cys Asn Ile Ser Cys Pro
 100 105 110
 Asn Pro Leu Pro Phe Arg Glu Tyr Arg Pro Ile Ser Gln Gly Val Ser
 115 120 125
 Asp Leu Val Gly Leu Pro Asn Gln Ile Cys Leu Gln Lys Thr Thr Ser
 130 135 140
 Thr Ile Leu Lys Pro Arg Leu Ile Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Asn Thr
 145 150 155 160
 Arg Glu Gly Val Cys Ile Thr Asp Pro Leu Leu Ala Val Asp Asn Gly
 165 170 175
 Phe Phe Ala Tyr Ser His Leu Glu Lys Ile Gly Ser Cys Thr Arg Gly
 180 185 190
 Ile Ala Lys Gln Arg Ile Ile Gly Val Gly Glu Val Leu Asp Arg Gly
 195 200 205
 Asp Lys Val Pro Ser Met Phe Met Thr Asn Val Trp Thr Pro Pro Asn
 210 215 220
 Pro Ser Thr Ile His His Cys Ser Ser Thr Tyr His Glu Asp Phe Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Thr Leu Cys Ala Val Ser His Val Gly Asp Pro Ile Leu Asn Ser
 245 250 255
 Thr Ser Trp Thr Glu Ser Leu Ser Leu Ile Arg Leu Ala Val Arg Pro
 260 265 270
 Lys Ser Asp Ser Gly Asp Tyr Asn Gln Lys Tyr Ile Ala Ile Thr Lys
 275 280 285
 Val Glu Arg Gly Lys Tyr Asp Lys Val Met Pro Tyr Gly Pro Ser Gly
 290 295 300
 Ile Lys Gln Gly Asp Thr Leu Tyr Phe Pro Ala Val Gly Phe Leu Pro
 305 310 315 320
 Arg Thr Glu Phe Gln Tyr Asn Asp Ser Asn Cys Pro Ile Ile His Cys
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Lys Ala Glu Asn Cys Arg Leu Ser Met Gly Val Asn Ser
 340 345 350

ES 2 639 122 T3

Lys Ser His Tyr Ile Leu Arg Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asn Leu Ser
 355 360 365

 Leu Gly Gly Asp Ile Ile Leu Gln Phe Ile Glu Ile Ala Asp Asn Arg
 370 375 380

 Leu Thr Ile Gly Ser Pro Ser Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Gln Pro
 385 390 395 400

 Val Phe Tyr Gln Ala Ser Tyr Ser Trp Asp Thr Met Ile Lys Leu Gly
 405 410 415

 Asp Val Asp Thr Val Asp Pro Leu Arg Val Gln Trp Arg Asn Asn Ser
 420 425 430

 Val Ile Ser Arg Pro Gly Gln Ser Gln Cys Pro Arg Phe Asn Val Cys
 435 440 445

 Pro Glu Val Cys Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp
 450 455 460

 Arg Leu Asn Trp Val Ser Ala Gly Val Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Thr
 465 470 475 480

 Ala Glu Asn Pro Val Phe Ala Val Phe Lys Asp Asn Glu Ile Leu Tyr
 485 490 495

 Gln Val Pro Leu Ala Glu Asp Asp Thr Asn Ala Gln Lys Thr Ile Thr
 500 505 510

 Asp Cys Phe Leu Leu Glu Asn Val Ile Trp Cys Ile Ser Leu Val Glu
 515 520 525

 Ile Tyr Asp Thr Gly Asp Ser Val Ile Arg Pro Lys Leu Phe Ala Val
 530 535 540

 Lys Ile Pro Ala Gln Cys Ser Glu Ser
 545 550

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende:

- 5 a. un fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra, consistiendo dicho fragmento en los aminoácidos 73 a 604 de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia al menos 95 % idéntica a la misma;
- 10 b. un complejo inmunoestimulante (ISC, del inglés immunostimulatory complex), comprendiendo dicho ISC una saponina; un fosfolípido seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina (PC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), ácido fosfatídico (fosfatidato) (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol fosfato (PIP), fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), fosforilcolina (SPH), fosforiletanolamina de ceramida (Cer-PE) y fosfoglicerol de ceramida; y colesterol; y
- c. uno o más excipientes;

15 para su uso en la prevención de una infección causada por virus Hendra y/o Nipah en un caballo o un cerdo, en donde dicha vacuna se administra a dicho caballo o dicho cerdo en una primera dosis y una segunda dosis, en donde cada una de dichas dosis comprende 50-100 µg de dicho fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra.

20 2. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada dosis comprende 100 µg de dicho fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra, consistiendo dicho fragmento en los aminoácidos 73 a 604 de la SEQ ID NO: 2 o la secuencia al menos 95 % idéntica a la misma.

25 3. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el fragmento soluble de la glucoproteína G de Hendra está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 64 a 1662 de la SEQ ID NO: 16.

4. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la glucoproteína G soluble del virus Hendra está presente en forma de dímero.

30 5. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde la glucoproteína G soluble del virus Hendra está presente en forma de tetrámero.

6. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde cada dosis comprende 250 µg de ISC.

35 7. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la saponina es Quil A y el fosfolípido es DPPC.

40 8. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proporción de Quil A: DPPC: Colesterol en la composición es 5:1:1 en peso.

9. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la segunda dosis se administra aproximadamente 21-28 días tras la primera dosis.

45 10. Un método de diferenciación de un sujeto vacunado con la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 de un sujeto expuesto a virus Hendra y/o Nipah que comprende la detección de la presencia de un anticuerpo en una muestra biológica aislada de dicho sujeto frente a al menos una de cualquiera de las siguientes proteínas víricas de HeV y/o NiV seleccionadas del grupo que consiste en, proteína de fusión (F), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la nucleocápside (N), en donde el sujeto es un caballo o un cerdo.

50 11. El método de la reivindicación 10, en donde el virus es un virus Hendra y el sujeto es un caballo.

12. El método de la reivindicación 10, en donde el virus es un virus Nipah y el sujeto es un cerdo.

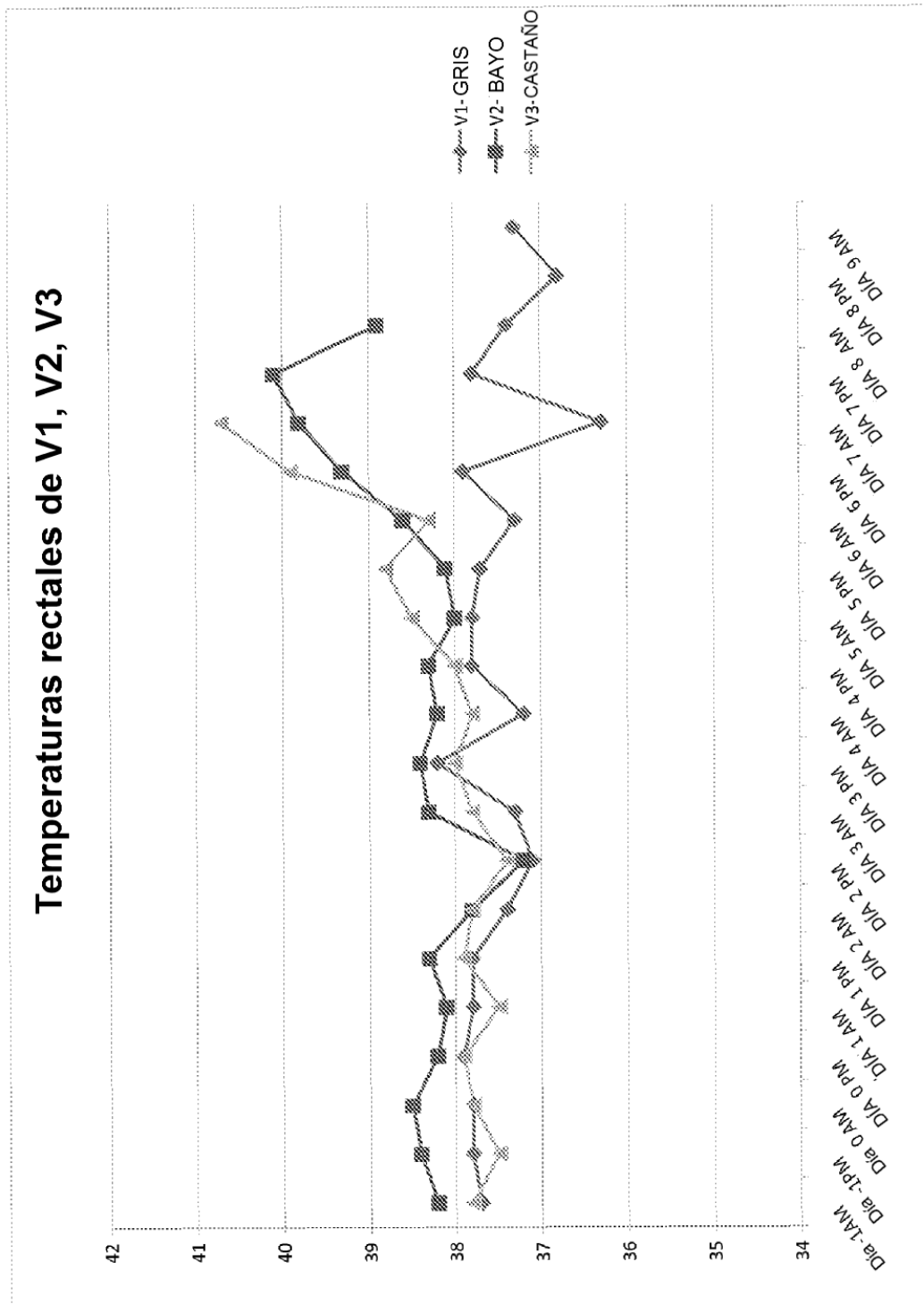


Figura 1

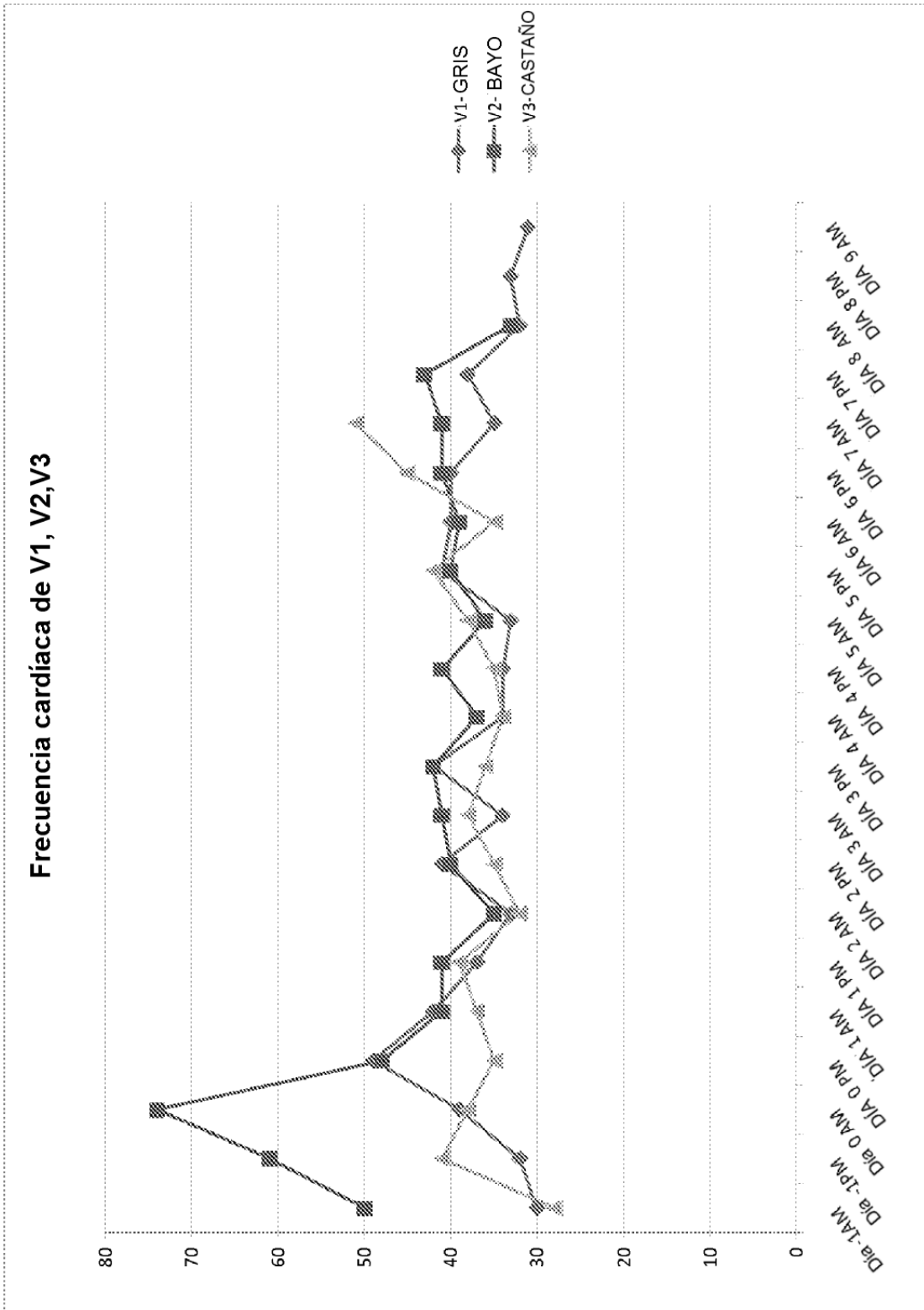


Figura 2

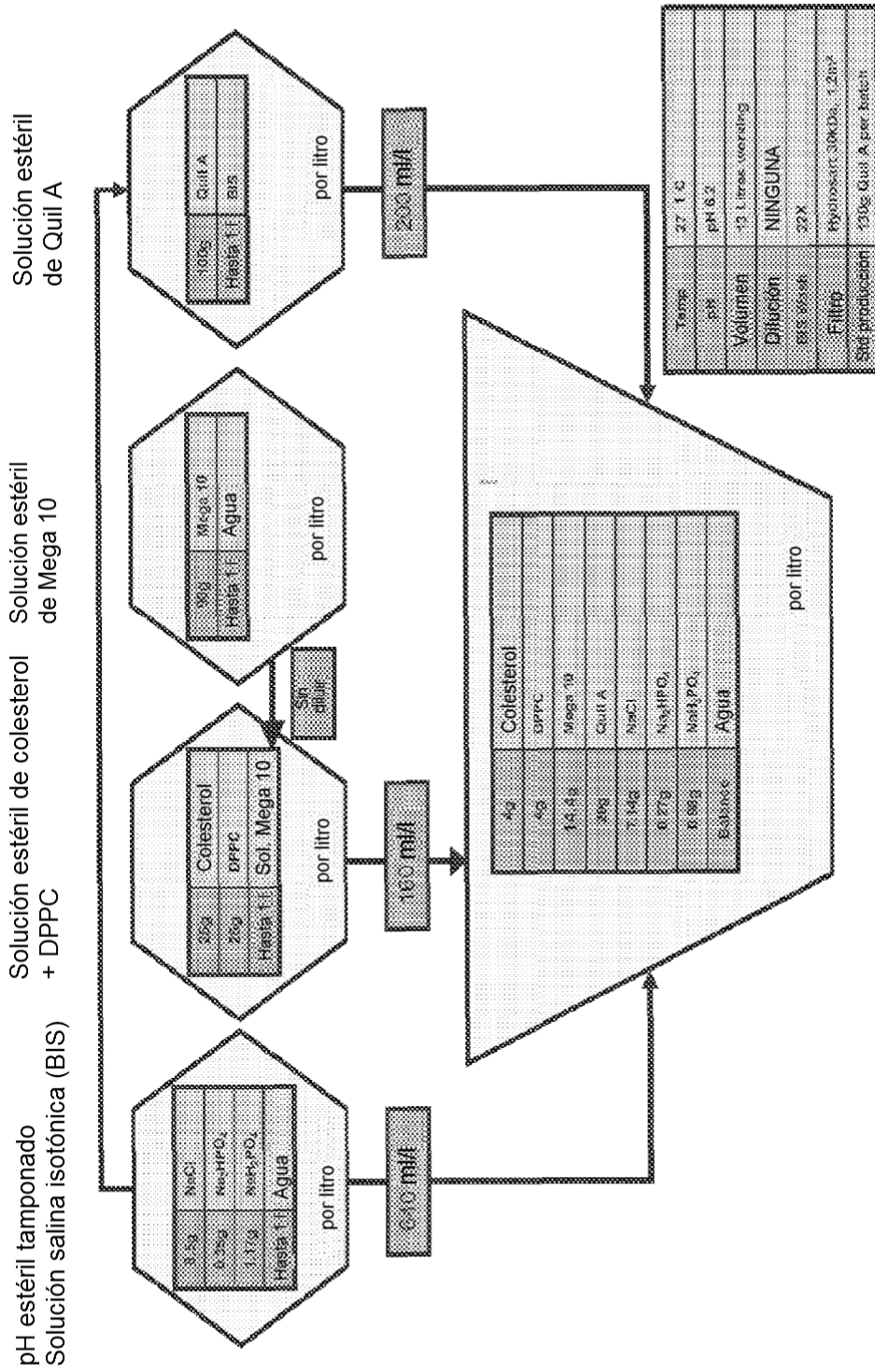


Figura 3

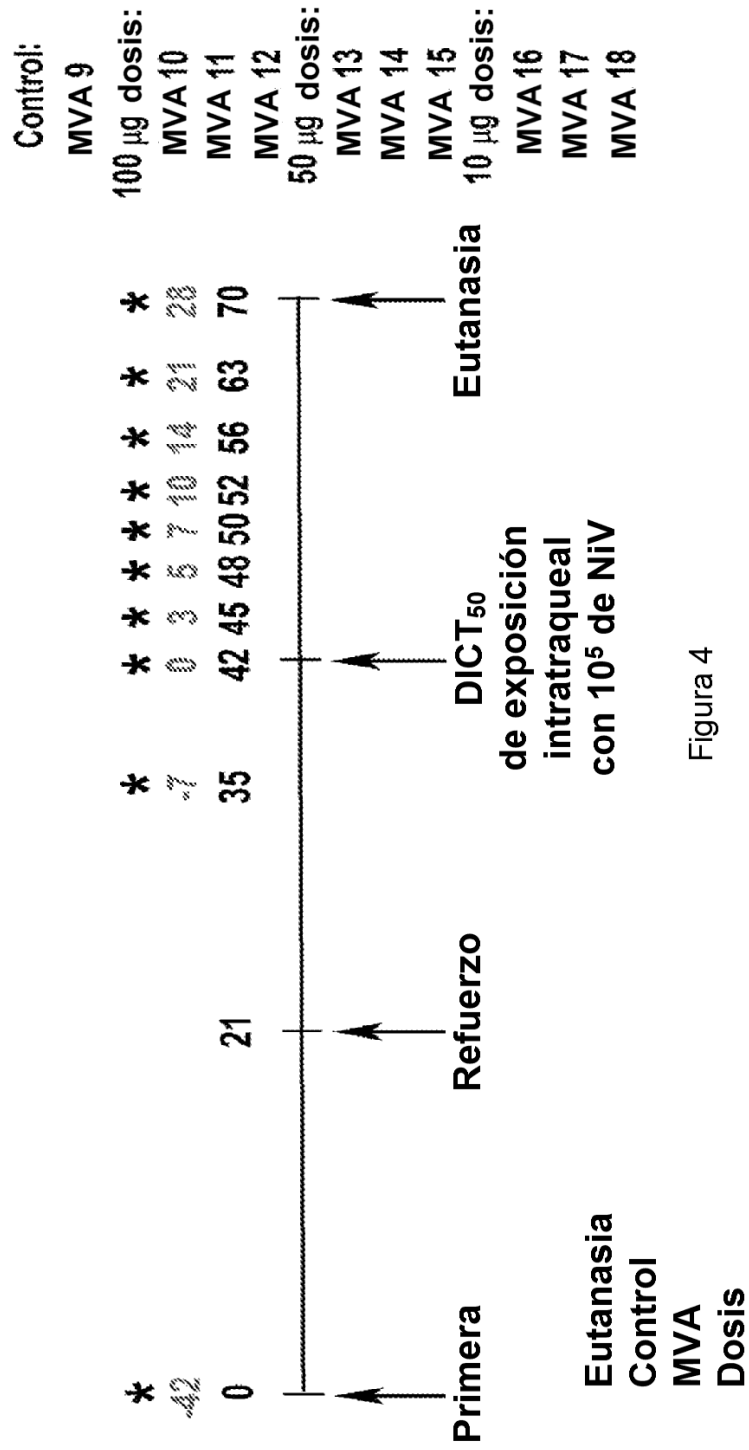


Figura 4

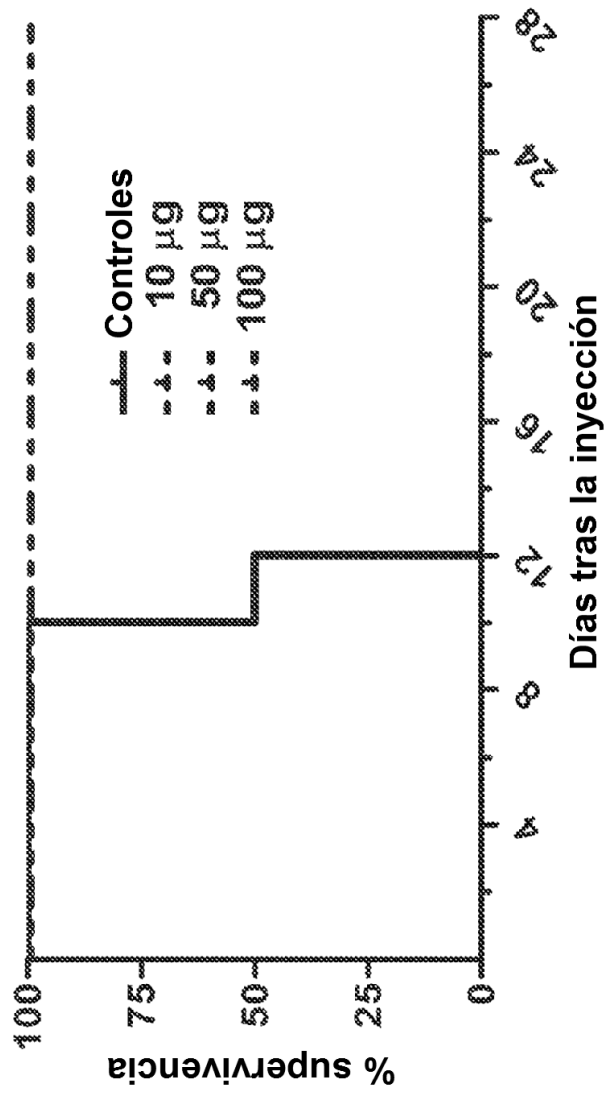


Figura 5

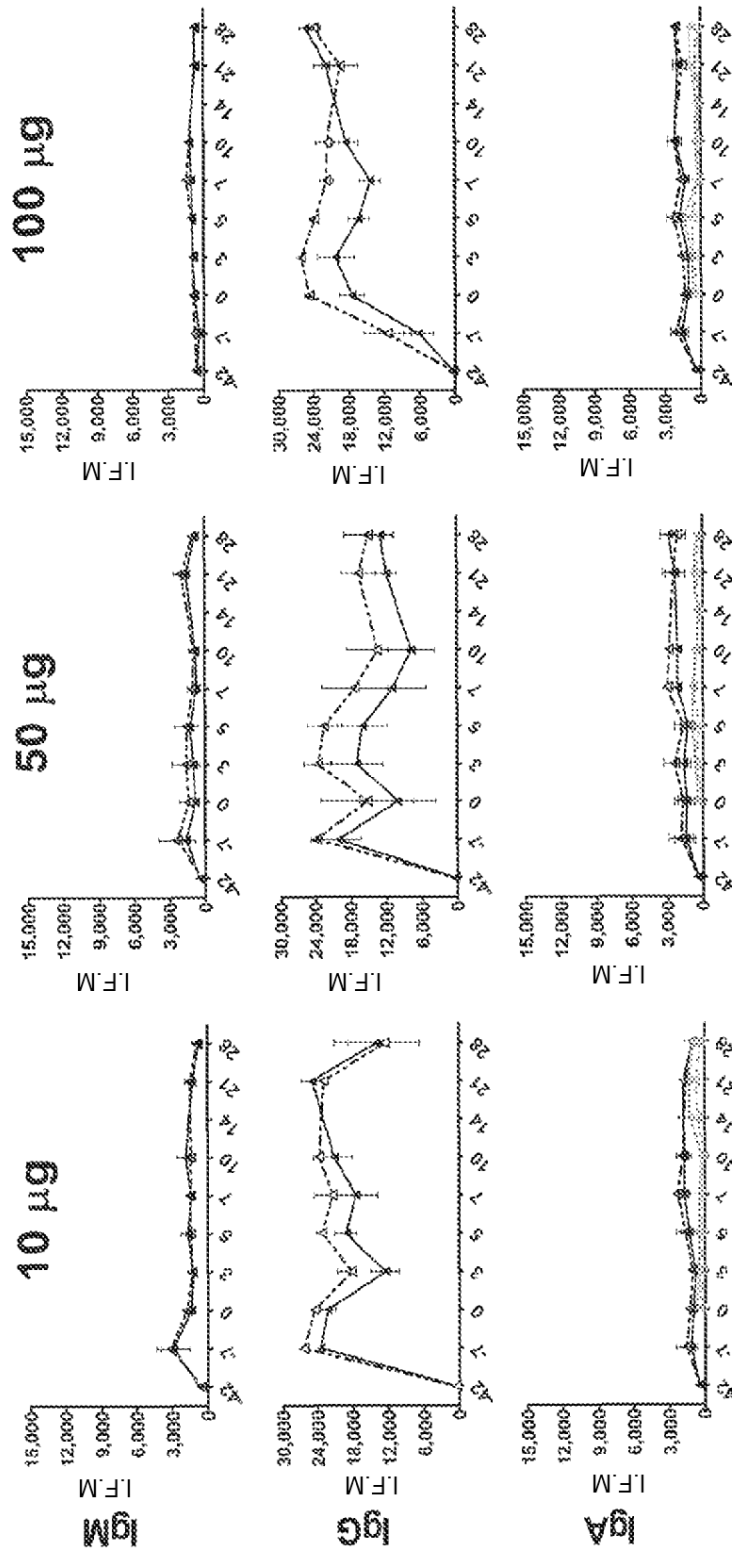


Figura 6