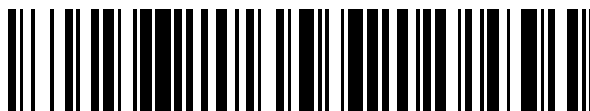


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 972**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2005** **E 12157071 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2495252**

54 Título: **Formas solubles de la glicoproteína G de los virus hendra y nipah**

30 Prioridad:

09.07.2004 US 586843 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2018

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
1401 Rockville Pike Suite 600
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**BRODER, CHRISTOPHER, C y
BOSSART, KATHARINE, N**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 673 972 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formas solubles de la glicoproteína G de los virus hendra y nipah

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formas solubles de una glicoproteína G del virus Hendra y a composiciones que comprenden la forma soluble de glicoproteína G del virus Hendra. La invención también se refiere a formas solubles de una glicoproteína G del virus Hendra para su uso en un método de vacunación de un sujeto contra el virus Hendra.

2. Descripción de los antecedentes

10 El virus Nipah y el virus Hendra son virus emergentes responsables de enfermedades fatales no reconocidas previamente en animales y seres humanos. Estos virus son miembros estrechamente relacionados de un nuevo género, el *Henipavirus*, en la familia Paramyxoviridae, un grupo diverso de virus de RNA de sentido negativo, grandes, envueltos, que incluye una variedad de patógenos humanos y animales importantes. La aparición reciente de estos dos virus parece ser el resultado de la exposición de nuevos huéspedes precipitada por ciertos cambios ambientales y de comportamiento. El virus Hendra se identificó en primer lugar, a partir de casos de enfermedad respiratoria grave que afectó fatalmente tanto a caballos como al hombre. Posterior a esa aparición, un brote de encefalitis febril grave asociada con muertes humanas ocurrió en Malasia. Estudios posteriores identificaron un virus similar al Hendra, ahora conocido como virus Nipah, como el agente etiológico de ese episodio. Estos virus son inusuales entre los paramixovirus por su capacidad de infectar y causar enfermedades con altas tasas de mortalidad en una serie de especies huéspedes, lo que incluye a los humanos, y son agentes zoonóticos de Nivel Biológico de Seguridad 4. En la actualidad, el gato parece ser el modelo animal pequeño ideal capaz de reproducir la patología observada en los humanos infectados.

15 Los virus Nipah y Hendra son virus seleccionados por el NIAID, de categoría C y poseen varias características que los hacen altamente adaptables para su uso como agentes de guerra biológica. Por ejemplo, ambos crecen fácilmente en cultivos celulares o huevos embrionados de pollo, producen títulos altos no concentrados cercanos a 1×10^8 TCID₅₀/ml, (14), son altamente infecciosos y se transmiten a través del tracto respiratorio (22, 27), y pueden amplificarse y extenderse en el ganado que sirve como una fuente para la transmisión a los seres humanos. La evidencia reciente indica, además, que es posible la transmisibilidad nosocomial del Niv a partir de pacientes con encefalitis a trabajadores de la salud (45, 60).

20 La fusión de la membrana de los virus envueltos con la membrana plasmática de una célula huésped receptiva es un requisito previo para la entrada e infección viral y un paso esencial en el ciclo de vida de todos los virus envueltos. La investigación hacia la disección y comprensión de los mecanismos de este proceso es un área de trabajo importante. No sólo proporciona una visión de las interacciones complejas entre los patógenos virales y sus células huéspedes, sino que, además, puede arrojar luz sobre el proceso bioquímico complejo y esencial de la fusión de membrana mediada por proteínas, y conducir, además, al desarrollo de nuevas estrategias de intervención y de vacunas. Esto se demostró en el campo de la investigación del VIH, donde el descubrimiento de los coreceptores buscados desde hace mucho tiempo involucrados en la entrada y la infección abrió una nueva era en el desarrollo de fármacos para bloquear el proceso de infección en el nivel de entrada (revisado en (3, 18)).

25 Los paramixovirus son virus envueltos de RNA de sentido negativo y abarcan una variedad de patógenos humanos y animales importantes, lo que incluye al virus del sarampión (MeV), virus de la parotiditis, virus Sendai (SeV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la peste bovina, virus del moquillo canino (CDV), virus parainfluenza humano (hPIV) 1-4, virus sincitial respiratorio (RSV), y virus de simios 5 (SV5) (revisado en (36)). En contraste con los retrovirus, los paramixovirus contienen dos glicoproteínas principales ancladas en la membrana, que aparecen como espículas que sobresalen de la membrana de la envoltura de la partícula viral cuando se observan bajo el microscopio electrónico. Una glicoproteína se asocia con la unión del virión a la célula huésped, y, en dependencia del virus particular, se designó como la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), la hemaglutinina (H), o la proteína G que no tiene actividad hemaglutinante ni neuraminidasa (revisado en (44)). La otra glicoproteína es la proteína de fusión (F) que participa directamente en facilitar la fusión de las membranas de las células huésped y del virus (revisado en (36)). Después de la unión del virus a una célula huésped permisiva, se produce una fusión a pH neutro (o independientemente del pH) entre las membranas plasmática y del virión, lo que resulta en la entrada de la nucleocápsida al citoplasma. En un proceso relacionado, las células que expresan estas glicoproteínas virales en sus superficies pueden fusionarse con células que portan el receptor, lo que resulta en la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios) bajo condiciones fisiológicas o de cultivo celular.

30 Las glicoproteínas de la envoltura. La glicoproteína de la envoltura HN es responsable de la unión del virión a su receptor, ácido siálico, en la célula objetivo como es el caso del hPIVs, NDV, SV5 y otros. Por el contrario, los morbilivirus, como el MeV y el CDV, tienen una proteína de unión (H) que posee sólo actividad hemaglutinante y no se unen al ácido siálico. El MeV fue el primer morbilivirus que se demostró que es capaz de utilizar una proteína de la

superficie celular como un receptor (19, 47), y fue la demostración de la interacción predicha entre la glicoproteína H del MeV y el receptor CD46 del MeV mediante el uso de experimentos co-ip y CD46 soluble (48). Además, los aislamientos de campo del MeV así como las cepas vacunales demostraron ser capaces de utilizar la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAMF7; CD150) (61). La SLAMF7 es capaz, además, de servir como receptor de varios otros morbilivirus, lo que incluye al CDV (62).

Una tercera clase de glicoproteínas de unión de los paramixovirus, que poseen los *Pneumovirinae* tales como el RSV, se denominan G, y no tienen actividades hemaglutinantes ni neuraminidasas (revisado en (44)). Las glicoproteínas de unión son proteínas de membrana de tipo II en las que el extremo amino (N) de la molécula se orienta hacia el citoplasma y el extremo carboxi (C) de la proteína es extracelular. La otra glicoproteína de la envoltura principal es la glicoproteína de fusión (F), y las F de estos virus son más similares, donde en todos los casos participa directamente en la mediación de la fusión entre el virus y la célula huésped a pH neutro.

La glicoproteína F de los paramixovirus es una glicoproteína integral de membrana tipo I donde el extremo N de la proteína es extracelular. Esta comparte varias características conservadas con otras proteínas de fusión viral, lo que incluye la glicoproteína de la envoltura (Env) de los retrovirus como la gp120/gp41 del VIH-I y hemaglutinina (HA) del virus de la influenza (revisado en (26)). La proteína F biológicamente activa consiste en dos subunidades unidas por disulfuro, F1 y F2, que se generan por la escisión proteolítica de un polipéptido precursor que se conoce como F0 (revisado en (34, 55)). De la misma manera, la Env del VIH-I y la HA de la influenza se activan proteolíticamente por una proteasa de la célula huésped, lo que conduce a la generación de una subunidad distal de la membrana análoga a F2 y a una subunidad anclada a la membrana análoga a F1. En todos los casos, la subunidad anclada en la membrana contiene un nuevo extremo N que es hidrofóbico y altamente conservado a través de las familias de virus y se denomina péptido de fusión (revisado en (30)). Todos los paramixovirus estudiados hasta la fecha requieren una proteína F y una de unión para la fusión eficiente, con la excepción del SV5 que puede mediar alguna fusión en ausencia de la HN (50). La evidencia de una asociación física entre estas glicoproteínas se observó sólo con un éxito limitado y sólo con el NDV (57), hPIV (73) y recientemente con el MeV (51), pero estas observaciones fueron a menudo con la ayuda de agentes químicos de reticulación. Se hipotetiza que después del acoplamiento del receptor, la proteína de unión debe de alguna manera señalar e inducir un cambio conformacional en F que conduce a la fusión virión/célula (35, 53). Se observó desde hace bastante tiempo que existen diferencias conformacionales en la HN y la F de un paramixovirus en dependencia de si se expresaron solas o en combinación (13).

Las glicoproteínas de la envoltura F de los Paramixovirus, como las de los retrovirus, se consideran proteínas de tipo de fusión de membrana de clase I. Una característica importante de las glicoproteínas de fusión de estos virus es la presencia de 2 dominios de alfa hélices que se denominan héptadas de repetición que participan en la formación de una estructura de trímeros de horquillas durante o inmediatamente después de la fusión (29, 56). Estos dominios se denominan, además, héptadas de repetición del extremo amino (N) y del extremo carboxilo (C) (o HR1 y HR2), y los péptidos correspondientes a cualquiera de estos dominios pueden inhibir la actividad de la glicoproteína de fusión viral cuando están presentes durante el proceso de fusión, lo que se observó primero con secuencias derivadas de la subunidad gp41 de la glicoproteína de la envoltura del VIH-I (32, 67). De hecho, los péptidos inhibidores de la fusión del VIH-I tienen éxito clínico y es probable que sean los primeros fármacos inhibidores de fusión aprobados. Se demostró, además, que las secuencias peptídicas de las héptadas N o C de la F del SV5, MeV, RSV, hPIV, NDV y SeV son potentes inhibidores de la fusión (33, 37, 52, 68, 74, 75). Se acepta generalmente que se produciría un cambio conformacional significativo durante la activación de la actividad fusogénica de la F de los paramixovirus. Las reactividades de unión a anticuerpos diferenciales de las formas precursoras y procesadas proteolíticamente de la F del SV5 (20) y en conjunción con la estructura del paquete de 6 hélices de posfusión de la F del SV5 (2), apoyan fuertemente el modelo de cambio conformacional, no solamente respecto al cambio estructural que tiene lugar de la prefusión a la posfusión, si no, además, del precursor F0 a la proteína madura F2-F1. El hecho de que la estructura posfusión de un núcleo de la F del paramixovirus probablemente se conserve a través de otros paramixovirus resulta respaldada adicionalmente por las estructuras del núcleo de la F del RSV (79) y del MeV (80). Sin embargo, estudios estructurales recientes sobre la glicoproteína F del NDV produjeron algunos hallazgos diferentes e interesantes. La estructura del trímero oligomérico de la F del NDV (en quizás el estado de prefusión o metaestable) ofreció alguna información alternativa que la distingue de la estructura clásica de la HA de la influenza, esto se refleja principalmente en la orientación completamente opuesta de las hélices superenrolladas centrales formadas por los segmentos HR1 (denominados, además, HRA) del trímero (9, 10). Hasta la fecha, esta es la única información estructural sobre la forma prefusión (o metaestable) de la F de un paramixovirus (de hecho la única otra estructura metaestable, clase I, distinta a la HA de la influenza), y tal vez representa una posible tercera clase de proteínas de fusión viral.

Aún hay que dilucidar la forma en que funcionan conjuntamente las glicoproteínas de fusión y de unión en mediar la fusión, pero hay dos modelos centrales propuestos para la función de la glicoproteína de unión en el proceso de fusión de membrana mediada por los paramixovirus, los cuales se detallaron recientemente por Morrison y colaboradores (41), en el contexto de la glicoproteína HN del NDV. En el primer modelo, las glicoproteínas de fusión y unión no se asocian físicamente en la membrana, pero después del acoplamiento al receptor hay una alteración en la glicoproteína de unión que facilita su asociación con F y al hacerlo imparte o facilita el cambio conformacional de F que conduce a la fusión de membrana. En el segundo modelo, la F y la glicoproteína de unión se preasocian y el acoplamiento al receptor induce una alteración conformacional en la glicoproteína de unión, y este proceso altera o libera una

interacción con F que permite que F avance hacia su estado activo de fusión - formación del paquete de 6 hélices justo antes o concomitante con la fusión de membrana. Los hallazgos en el NDV demuestran la accesibilidad variable del dominio HR1 durante el proceso, donde los HR1 de la F son accesibles a un anticuerpo inhibidor de la fusión específico cuando F se presenta en el contexto de la HN, sin embargo la expresión de F sola resulta en una versión no fusogénica de F con una conformación claramente alterada que tiene un dominio HR1 que ya no es accesible al anticuerpo (41). El segundo modelo es que la glicoproteína de unión sostiene a F en su conformación no fusogénica y tras el acoplamiento del receptor y el cambio conformacional en la glicoproteína de unión F se libera para experimentar cambios conformacionales que conducen a formación de paquetes de 6 hélices y a la facilitación de la fusión de membrana. Esto se respalda por observaciones de que la F del paramixovirus expresada sola no media la fusión (con la excepción del SV5 bajo ciertas condiciones) y tiene accesibilidad variable a los anticuerpos de ciertos dominios tales como el dominio HRI de la F del NDV (41). Esto es debido quizás a que F sola pasa a una conformación intermedia o de fusión activada en un momento inapropiado, lo que sería coherente con las observaciones de la fusión defectuosa o activada de la gp41 del VIH-1 conocida, además, como espículas-muertas (17). Los hallazgos preliminares con el HeV y el NiV apoyan este segundo modelo. Finalmente, se reveló recientemente a nivel molecular a partir de estudios sobre la glicoproteína HN del NDV que la glicoproteína de unión de un paramixovirus experimenta una alteración de conformación específica cuando se une al receptor (58, 59). Estos estudios revelaron diferencias claras en la estructura de la HN cuando la glicoproteína unida al receptor se compara con la estructura de la HN no unida al receptor. Además, todas las glicoproteínas de la envoltura viral conocidas son homo o heterooligómeros en sus formas maduras y funcionales (revisado en (16)). Las proteínas multiméricas, como estas, generalmente interactúan en grandes áreas, lo que hace probable que existan diferencias estructurales entre las subunidades monoméricas y el oligómero maduro (31). Esta característica puede, además, traducirse en diferencias en la estructura antigénica y se demostró para una serie de proteínas, más notablemente para la glicoproteína HA de la influenza trimérica (69) y la gp120/gp41 del VIH-1 (7). De hecho, se mapeó un determinante neutralizante potente, específico del trímero, para la interfaz entre las subunidades adyacentes de HA, y se identificaron y mapearon anticuerpos anti Env del VIH-1 específicos del oligómero para epítopos dependientes de la conformación en la gp41 (7). Hasta el momento, todas las glicoproteínas de fusión de los paramixovirus, retrovirus, y del virus de la influenza parecen ser homotrímeros (8, 9, 21, 54, 71), y se demostró que varias proteínas de unión HN son tetraméricas, compuestas por un dímero de homodímeros. Por ejemplo, la HN del NDV puede formar dímeros y tetrámeros en la superficie viral (40, 43), y recientemente se resolvió la estructura cristalina de la región de la cabeza globular del dímero de HN del NDV (15). Finalmente, y de importancia para la comprensión de ciertos aspectos de la respuesta inmune a estos virus y para el desarrollo de vacunas, encontramos estas glicoproteínas de envoltura principales de estos virus contra las que virtualmente se dirigen todos los anticuerpos neutralizantes de virus.

Paramyxovirus patógenos emergentes. En 1994, se aisló un nuevo paramixovirus, a partir de casos fatales de enfermedad respiratoria en caballos y seres humanos, y se demostró que se relacionaba distantemente con el MeV y otros miembros del género morbillivirus; se denominó provisionalmente morbillivirus equino (EMV) pero desde entonces se renombró virus Hendra (HeV) (46). El primer brote de enfermedad respiratoria severa en el suburbio de Brisbane de Hendra Australia resultó en la muerte de 13 caballos y su entrenador, y la infección no fatal de un caballerizo y de otros 7 caballos. Aproximadamente al mismo tiempo, en un incidente no relacionado a casi 100 km al norte de Hendra, un hombre de 35 años experimentó una breve enfermedad meningítica aséptica después de cuidar y ayudar en las necropsias de dos caballos que se demostró posteriormente que habían muerto como resultado de una infección por HeV. Trece meses después este individuo sufrió una recurrencia de encefalitis grave caracterizada por actividad epiléptica focal y generalizada no controlada. Una variedad de estudios que se realizaron en la evaluación de esta fatalidad, que incluyó serología, PCR, microscopía electrónica (EM) e inmunohistoquímica, sugirió fuertemente que el HeV fue de hecho la causa de la encefalitis de este paciente, y que el virus se adquirió a partir de los caballos infectados con HeV 13 meses antes (49). En total, quince caballos y dos personas murieron en los dos episodios. Hasta el momento la fuente del virus emergente era indeterminada, pero más recientemente se encontró que aproximadamente el 50 % de ciertas especies de murciélagos frutales australianos, comúnmente conocidos como zorros voladores, tienen anticuerpos contra el HeV y se aislaron virus similares al Hendra a partir de fluidos uterinos de los murciélagos. Parece que estos animales son el huésped natural del virus (22, 24, 25, 76). Recientemente, la secuencia de ácidos nucleicos de los genes del HeV se analizó y comparó con la de otros paramixovirus (64, 77, 78). Estos estudios confirmaron que el HeV es miembro de los *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*.

Posteriormente a estos acontecimientos, se produjo en 1998 un brote de encefalitis grave en personas con contacto directo con cerdos en Malasia y Singapur (1). El brote se observó por primera vez en septiembre de 1998 y para mediados de junio de 1999, se reportaron en Malasia más de 265 casos de encefalitis, que incluyeron 105 muertes, y se reportaron 11 casos de enfermedad con una muerte en Singapur. Este brote tuvo un enorme impacto económico negativo, que continúa hasta la fecha. Aunque resultaron exitosas, las medidas tomadas en los primeros días del brote resultaron en el sacrificio de aproximadamente 1.3 millones de cerdos y el cierre virtual de la industria porcina en la Malasia peninsular. Los estudios de EM, serológicos y genéticos indicaron que este virus es, además, un paramixovirus y estaba estrechamente relacionado con el HeV. Este virus se denominó virus Nipah (NiV) por la pequeña ciudad de Malasia de la cual se obtuvo el primer aislado a partir de líquido cefalorraquídeo de un caso humano fatal (11, 12, 23, 38, 39).

La mayoría de los pacientes humanos presentan encefalitis aguda, que en el brote de Malasia de 1998-1999 resultó en una tasa de mortalidad de aproximadamente el 40 %, pero la infección puede presentarse, además, como un episodio no encefálico o asintomático con seroconversión. Curiosamente, la infección con el NiV puede, además, tomar un curso más crónico donde la enfermedad neurológica más grave ocurre tarde (más de 10 semanas) después de una infección noencefálica o asintomática. Por otro lado, se observó, además, la recurrencia de manifestaciones neurológicas (encefalitis recidivante) en pacientes que se recuperaron previamente de encefalitis aguda. Los casos de encefalitis recidivante se presentaron desde varios meses hasta casi dos años después de la infección inicial (72). En conjunto, hubo una tasa de incidencia cercana al 10 % de manifestaciones encefálicas tardías con una tasa de mortalidad del 18 %. Así, tanto con el NiV como con el HeV, es posible un período prolongado de infección antes de que se produzca una enfermedad neurológica grave. Los mecanismos subyacentes que permiten a estos virus, especialmente al NiV, escapar de la eliminación por el sistema inmunológico durante un período tan prolongado, se desconocen completamente.

En el caso del NiV, la presentación tardía de la enfermedad neurológica y la respuesta de subclase IgG mostraron similitudes con la Panencefalitis Esclerosante Subaguda (SSPE), una manifestación tardía rara de la infección por el MeV (72). Fue la caracterización molecular del HeV y del NiV lo que los distinguió como paramyxovirus claramente nuevos. Las familias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*, y *Bornaviridae* son todas de virus envueltos de RNA de sentido negativo que comparten una organización del genoma, estrategias de replicación y estructura del dominio de la polimerasa similares (63). Estas familias se agrupan en el orden Mononegavirales, el primer taxón por encima de la taxonomía de virus a nivel familiar. El tamaño del genoma en los Mononegavirales es amplio, ~8.9-19.1 kb. Los genomas de los paramyxovirus, como grupo, se consideran generalmente de magnitud estrecha, con tamaños en el intervalo de 15.1-15.9 kb, excepto para el HeV y el NiV cuyos genomas de 18.2 kb, están mucho más cerca en tamaño a los Filoviridae. Gran parte de esta longitud añadida son regiones no traducidas en el extremo 3' en las seis unidades de transcripción, de nuevo muy similar a los Filoviruses Ébola y de Marburgo (63). Además, la proteína P es mayor por 100 residuos (la más larga conocida), y existe una pequeña proteína básica (SB) en el HeV de función desconocida. En conjunto, las características moleculares del HeV y el NiV los convierten en paramyxovirus poco comunes, al igual que su capacidad para causar enfermedades potencialmente fatales en varias especies, lo que incluye a los humanos.

Patogénesis. El desarrollo o caracterización de modelos animales para estudiar estas nuevas zoonosis virales es importante para comprender sus características patogénicas y en el desarrollo de fármacos. De los dos casos fatales de infección por HeV en humanos, el primero fue el resultado de una enfermedad respiratoria grave después de varios días con soporte de vida ventilado. Los pulmones del paciente presentaban lesiones macroscópicas de congestión, hemorragia y edema asociados con una alveolitis crónica histológica con sincitios. El segundo caso fatal fue uno de leptomeningitis con linfocitos y células plasmáticas y focos de necrosis en varias partes del parénquima cerebral, después de la infección inicial más de un año antes (revisado en 27). Se observaron, además, células endoteliales multinucleadas tanto en las vísceras como en el cerebro. En contraste, hubo muchos más casos humanos de infección con NiV. Más de 30 individuos resultantes del gran brote de NiV en Malasia y Singapur se sometieron a autopsia, y las características inmunológicas e histológicas incluyeron la infección endotelial sistémica acompañada de vasculitis, trombosis, isquemia y necrosis (revisado en 27). Estos cambios se observaron especialmente en el sistema nervioso central (CNS). El análisis inmunohistoquímico mostró, además, la presencia generalizada de antígenos del NiV en neuronas y otras células parenquimatosas en focos necróticos observados en el CNS, así como en células endoteliales y medios de vasos afectados (27). En humanos infectados, se observó, además, evidencia de vasculitis e infección endotelial en la mayoría de los órganos examinados. La infección de células endoteliales diseminada, vasculitis y la infección de células parenquimatosas del CNS desempeñan una función esencial en el desenlace fatal de la infección por el NiV en los seres humanos (revisado en (27)). Los principales episodios zoonóticos en la naturaleza implicaron a caballos en los casos del HeV y al cerdo en el caso del NiV. Ambos virus presentan un tropismo por células huéspedes notablemente amplio en estudios *in vitro* (4, 5). Estas observaciones correlacionan con lo que se observó en la infección natural y experimental.

Se llevaron a cabo infecciones experimentales de caballos y cerdos con HeV y NiV respectivamente y se examinó un caballo naturalmente infectado con NiV. La patología causada por cualquiera de los virus en caballos parece ser más severa que la causada por el NiV en cerdos. Además de en los cerdos, también se practicó la infección por HeV de gatos y en este caso la enfermedad se asemeja a la observada en los caballos, que se caracteriza por una enfermedad vascular generalizada con los efectos más graves observados en el pulmón (28). Además, se infectaron experimentalmente curieles con HeV (28) y la patología observada difirió significativamente en varios aspectos en comparación con los casos humanos así como con los caballos natural y experimentalmente infectados. En curieles el HeV causó una enfermedad vascular generalizada pero, a diferencia de en caballos y gatos, hubo poco o ningún edema pulmonar. Histológicamente, la enfermedad vascular fue prominente en las arterias y venas, y en muchos órganos tales como el pulmón, riñón, bazo, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal y músculos esquelético e intercostal. La infección por NiV del curiel todavía no se describe bien.

Con respecto a otros modelos de animales de laboratorio pequeños, el NiV y el HeV no causan enfermedad en los ratones incluso después de la administración subcutánea, sin embargo, y no sorprendentemente, matarán a ratones si se administran intracranalmente. Además, no hay evidencias serológicas de NiV en roedores en Malasia, y varios

cientos de sueros se comprobaron durante el brote. Se observó, además, evidencia de infecciones naturales por NiV en perros y gatos.

En la infección experimental por NiV del gato, las lesiones macroscópicas en animales con signos clínicos graves se asemejaban mucho a las de los gatos infectados con HeV. Estas consistían en hidrotórax, edema en los pulmones y ganglios linfáticos pulmonares, espuma en los bronquios, y consolidación densa de color rojo púrpura en el pulmón. Hubo, además, características similares en la apariencia histológica, hemorragia alveolar y peribronquial, perivascular difusa, y edema, vasculitis que afectaba arterias y arteriolas, alveolitis, formación de sincitios dentro de las células endoteliales y células epiteliales alveolares (revisado en (27)). En conjunto, la evidencia hasta la fecha indica que el gato representa un modelo animal en el que la patología vista se asemeja más estrechamente al curso letal de la enfermedad humana. Además, la infección de gatos con NiV o HeV es uniformemente fatal. El NiV y el HeV parecen causar enfermedades similares pero con algunas variaciones notables, y aunque los procesos patológicos básicos se describen bien, se conoce menos sobre los factores que influyen claramente en el curso de la enfermedad en dependencia de la especie infectada. Esta es una preocupación especial en las infecciones humanas, donde existe una notable capacidad de estos virus para persistir en el huésped (hasta 2 años) antes de causar una recurrencia de la enfermedad grave y a menudo fatal. Los gatos sucumben en 6-8 días a la infección subcutánea con 5,000, y a la administración subcutánea u oral de 50,000, TCID₅₀ de HeV purificado, de un pase bajo (65, 66, 70). La infección experimental de gatos con NiV confirmó la susceptibilidad de esta especie a la infección oronasal con 50,000 TCID₅₀ de NiV (42). En resumen, el síndrome clínico y patológico inducido por el NiV en gatos fue comparable con el asociado a la infección por HeV en esta especie, excepto que en la infección fatal con NiV hubo una extensa inflamación del epitelio respiratorio, asociada con la presencia de antígeno viral.

En resumen, recientemente se confirmaron brotes recurrentes de NiV que resultan en un número significativo de muertes humanas (Fatal fruit bat virus sparks epidemics in southern Asia. Nature 429, 7, 06 de mayo de 2004). El HeV se conoce, además, por causar muertes en humanos y animales y se relaciona genéticamente e inmunológicamente estrechamente con el NiV. En la actualidad no existen vacunas ni fármacos para la prevención de infecciones o enfermedades causadas por el virus Nipah o el virus Hendra. Tanto el virus Nipah como el virus Hendra son agentes prioritarios categoría C de preocupación de biodefensa del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, de Estados Unidos. Además, dado que estos virus son agentes zoonóticos de Nivel de Seguridad Biológica 4 (BSL-4), la producción de vacunas y/o diagnósticos, con seguridad es muy costosa y difícil. Así, existe la necesidad de vacunas y diagnósticos para los virus Nipah o Hendra que permitan una producción de alto rendimiento de vacunas y/o diagnósticos.

Resumen de la invención

La presente divulgación supera los problemas y desventajas asociadas con las estrategias y diseños actuales y proporciona nuevas herramientas y métodos para el diseño, producción y uso de formas solubles de la glicoproteína de la envoltura G del virus Hendra.

En un aspecto, la invención proporciona un oligómero de monómeros peptídicos solubles del ectodominio de la proteína G del virus Hendra, en donde un monómero comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 71-604 de la proteína G del virus Hendra; en donde un monómero no contiene la secuencia de aminoácidos completa de la proteína G del virus Hendra; y en donde un monómero retiene una o más características de una proteína G del virus Hendra nativa seleccionada del grupo que consiste en: capacidad de interactuar con una célula receptora del huésped viral, capacidad para provocar una reacción de anticuerpo, capacidad de provocar una reacción de anticuerpo neutralizantes, capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped por el virus Hendra.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligómero del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona un oligómero de monómeros peptídicos solubles del ectodominio de la proteína G del virus Hendra para uso en un método de vacunación de un sujeto contra la infección por virus Hendra, en donde los monómeros son i) monómeros del ectodominio de la proteína G del virus Hendra pero que carece de todo o parte del dominio transmembrana y de todo o parte de la cola citoplásmica; ii) comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 71-604 de la proteína G del virus Hendra; y iii) retienen una o más características de una proteína G nativa del virus Hendra seleccionada del grupo que consiste en: capacidad de interactuar con una célula receptora viral, capacidad de provocar una reacción de anticuerpos, capacidad de provocar una reacción de anticuerpos neutralizante, capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped por el virus Hendra.

También se divulgan en la presente descripción polinucleótidos o polipéptidos o fragmentos de estos que codifican una proteína G soluble derivada del virus Nipah.

También se divulgan en la presente descripción métodos para producir la proteína G soluble derivada del virus Hendra y/o del virus Nipah.

También se divulgan en la presente descripción vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos que codifican una proteína G soluble derivada del virus Hendra y/o Nipah.

- 5 Aquí se describen también proteínas de fusión que comprenden un polipéptido que codifica el monómero peptídico soluble y uno o más polipéptidos diferentes que potencian la estabilidad de los monómeros peptídicos solubles, potencian la inmunogenicidad de los monómeros peptídicos solubles y/o ayudan en la purificación de los monómeros peptídicos solubles.

También se divulgan en la presente descripción anticuerpos y fragmentos de estos, tales como anticuerpos neutralizantes, específicos para una proteína G soluble derivada del virus Hendra y/o Nipah y aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas de tales anticuerpos.

- 10 También se divulgan en la presente descripción una vacuna de subunidades que comprende oligómeros de la invención.

También se divulgan en la presente descripción métodos para prevenir la infección con virus Hendra y/o Nipah en un sujeto o mitigar una infección de virus Hendra y/o Nipah en un sujeto.

- 15 Aquí se describen también estuches de diagnóstico que comprenden los polinucleótidos, polipéptidos y/o anticuerpos de la divulgación

Otras realizaciones y ventajas de la invención se exponen en parte en la descripción, que sigue, y en parte, pueden ser obvias a partir de esta descripción, o puede aprenderse de la práctica de la invención.

Descripción de las Figuras y Tablas

- 20 La Figura 1 muestra la expresión de la glicoproteína de la envoltura G del HeV soluble. El virus Vaccinia que codifica una proteína G del HeV con etiqueta myc o etiqueta S se produjo por marcado metabólico en células HeLa. El control es la proteína G del HeV de tipo salvaje. La precipitación específica de cada construcción sG se muestra por precipitación a partir de lisados o sobrenadantes mediante el uso de MAb para myc o perlas S.

- 25 La Figura 2 muestra la inhibición de la fusión mediada por HeV y NiV por la sG con etiqueta S. Se infectaron células HeLa con virus vaccinia recombinantes que codificaban las glicoproteínas G y F del HeV o F y G del NiV, junto con un vaccinia recombinante que codifica una RNA polimerasa T7 (células efectoras). Cada tipo de célula objetivo designada se infectó con el virus vaccinia vCB21R reportero codificante de la LacZ de *E. coli*. Cada tipo de célula objetivo (1×10^5) se sembró en pocillos duplicados de una placa de 96 pocillos. Se añadieron los sobrenadantes de control o de la sG con etiqueta S y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Las células que expresan la glicoproteína del HeV o del NiV (1×10^5) se mezclaron después con cada tipo de célula objetivo. Después de 2.5 h a 37 °C, se añadió Nonidet P-40 y se cuantificó la actividad β -Gal. Paneles A y B: Inhibición de la fusión mediada por el HeV por el sobrenadante infectado por la sG con etiqueta S o el sobrenadante infectado con el WR en células U373 (Panel A) o células PCI 13 (Panel B). Paneles C y D: Inhibición de la fusión mediada por el HeV y el NiV por la sG con etiqueta S en células U373 (Panel C) o células PCI 13 (Panel D). Paneles E y F: Inhibición de la fusión mediada por el HeV y el NiV por la sG con etiqueta myc purificada en células U373 (Panel E) o células PCI 31 (Panel F).

- 35 La Figura 3 muestra una inmunofluorescencia indirecta de líneas celulares permisivas y no permisivas teñidas con la glicoproteína de la envoltura G del sHeV. Las células se sembraron en placas de laboratorio de 8 pocillos Lab-Tek II en el medio apropiado y se incubaron durante 3 días. Las células se fijaron con acetona durante 2 minutos. Las células HeLa representan una línea celular no permisiva de fusión mientras que las U373, PCI 13 y Vero representan líneas de células permisivas de fusión. Las células se tiñeron con la sG con etiqueta S seguido de un antisuero de conejo específico antiproteína G de HeV y un conjugado Alexa Fluor 488 anticonejo de burro. Las muestras se examinaron con un microscopio Olympus con un accesorio de luz fluorescente reflejada y un filtro Olympus U-M41001. Todas las imágenes se obtuvieron con una cámara digital SPOT RT CCD con un aumento original de 40 $\times$. Panel A: sG con etiqueta S y conjugado Alexa Fluor 488 anticonejo de burro. Panel B: sG con etiqueta S, antisuero antiproteína G del HeV, y conjugado Alexa Fluor 488 anticonejo de burro.

- 45 La Figura 4 muestra la expresión de la glicoproteína de la envoltura G del NiV soluble. El virus vaccinia que codifica la proteína G del HeV soluble con etiqueta S, o los vectores de expresión plasmídicos que codifican la proteína G del HeV o del NiV soluble con etiqueta S se produjeron por marcaje metabólico en células HeLa. La precipitación específica de cada construcción sG se muestra por precipitación a partir de lisados o sobrenadantes mediante el uso de perlas S.

- 50 La Figura 5 muestra el análisis de las estructuras oligoméricas de la glicoproteína de la envoltura G del HeV soluble. Las células HeLa se infectaron con la proteína G del sHeV (con etiqueta S) que codifica el virus vaccinia y se incubaron 16 h a 37 °C (4 pocillos de una placa de 6 pocillos). Con comienzo a las 6 h posinfección, las células se marcaron

metabólicamente durante la noche con [35S]-met/cis. Los sobrenadantes se eliminaron, se clarificaron por centrifugación, se concentraron, se intercambió la solución amortiguadora en PBS. Una mitad (400 µl) de la proteína G del sHeV se reticuló luego con DTSSP [3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato)] (4 mM/RT°/15 min) apagado con 100 mM de Tris pH 7.5. Las preparaciones reticuladas y no reticuladas se dividieron después en dos porciones iguales y se colocaron en capas sobre gradientes de sacarosa continua (5-20 %) (4 gradientes) y se fraccionaron. Todas las fracciones se precipitaron después con agarosa de proteína S, y las muestras de sG metabólicamente marcadas se separaron mediante SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras y no reductoras y se detectaron por autorradiografía.

La Figura 6 muestra un esquema de construcciones de la glicoproteína G del HeV soluble. Enlazador de la cadena Igκ (Sec. con núm. de ident.: 10); enlazador de 15 aa (Sec. con núm. de ident.: 11); etiqueta del péptido S (Sec. con núm. de ident.: 12); etiqueta del epitopo c-myc (Sec. con núm. de ident.: 13); enlazador de 15aa (Sec. con núm. de ident.: 14).

La Figura 7 muestra un perfil de peso molecular de la sG del HeV. Se separó un panel de patrones de alto peso molecular en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 y se generó una curva de calibración. Las muestras de la sG con etiqueta S purificada y de la sG con etiqueta myc se separaron en la columna Superdex 200 calibrada y se fraccionaron. Se calcularon los valores de K_{av} de los picos mayores de la sG y se determinaron sus pesos moleculares aparentes mediante el uso de la curva de calibración de los patrones de peso molecular. La figura muestra los tres picos principales observados con la sG con etiqueta S. Las estimaciones moleculares mostradas asociadas con cada uno de los tres picos (pico 1, 2 y 3) son los promedios de siete separaciones independientes de tres diferentes preparaciones de la sG con etiqueta S.

La Figura 8 muestra las formas oligoméricas de la sG con etiqueta S. Se infectaron células HeLa con virus vaccinia que codifica para la sG con etiqueta S y se incubaron 16 h a 37 °C. Con inicio a las 6 h después de la infección, las células se marcaron metabólicamente durante la noche con {35S}-metionina/cisteína. Los sobrenadantes se eliminaron, se clarificaron por centrifugación, se concentraron, se intercambió la solución amortiguadora a PBS. Después se reticuló una mitad (200 µl) de la sG con etiqueta S con DTSSP [3,3'-Ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato)] (4 mM/RT°/30 min) atenuado con Tris 100 mM pH 7.5. Las preparaciones reticuladas y no reticuladas se colocaron en capas sobre gradientes continuos (5-20 %) de sacarosa (2 gradientes) y se fraccionaron. Todas las fracciones se dividieron en dos tubos (para condiciones reductoras y no reductoras), las fracciones se precipitaron después con agarosa para proteína S y las muestras de la sG marcadas metabólicamente se separaron mediante SDS-PAGE al 7.5 % en condiciones reductoras y no reductoras y se detectaron por autorradiografía. Se indican la parte inferior y la parte superior de los gradientes. A: no reticulado y no reducido, B: no reticulado y reducido, C: reticulado y no reducido, D: reticulado y reducido.

La Figura 9 muestra la forma oligomérica de la proteína G de cadena completa del HeV. Las células HeLa se infectaron con el virus vaccinia que codifica la proteína G del HeV y se incubaron 16 h a 37 °C. Con inicio a las 6 h después de la infección, las células se marcaron metabólicamente durante la noche con {35S}-metionina/cisteína. Los sobrenadantes se eliminaron y las células se mantuvieron durante 2 h en medio completo, se lavaron dos veces en PBS y se recuperaron. Las células que expresaban la proteína G del HeV no reticulada se lisaron en solución amortiguadora que contenía Triton-X, se clarificaron por centrifugación, y se colocaron en capas sobre un gradiente continuo de sacarosa (5-20 %) y se fraccionaron. Todas las fracciones se dividieron en 2 tubos (para condiciones reductoras y no reductoras), después las fracciones se precipitaron con antisuero anti HeV y después se pasaron por sefarsa de proteína G, y las muestras de la proteína G del HeV metabólicamente marcadas se separaron por SDS-PAGE al 7.5 % bajo condiciones reductoras y no reductoras y se detectaron por autorradiografía. Se indican la parte inferior y la parte superior de los gradientes. A: no reticulado y no reducido, B: no reticulado y reducido.

La Figura 10 muestra el ensayo de sincitios basado en inmunofluorescencia del HeV y del NiV. Las células Vero se sembraron en placas de 96 pocillos y se crecieron hasta una confluencia del 90 %. Las células se pretrataron con la sG con etiqueta S por 30 min a 37 °C antes de la infección con 1.5×10^3 TCID₅₀/ml y 7.5×10^2 TCID₅₀/ml del HeV o NiV vivos (combinados con la sG con etiqueta S). Las células se incubaron durante 24 horas, se fijaron en metanol y se marcaron inmunofluorescentemente por la proteína P antes de la microscopía digital. Las imágenes se obtuvieron mediante el uso de un microscopio invertido Olympus IX71 acoplado a una cámara a color de alta resolución Olympus DP70 y todas las imágenes se obtuvieron con un aumento original de 85×. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia con FITC de los HeV y NiV marcados con anti-P. A: infecciones de control no tratadas, B: infecciones en presencia de 100 µg/ml de la sG con etiqueta S.

La Figura 11 muestra la inhibición de la infección con HeV y NiV por la sG con etiqueta S. Las células Vero se sembraron en placas de 96 pocillos y se crecieron hasta una confluencia del 90 %. Las células se pretrataron con la sG con etiqueta S por 30 min a 37 °C antes de la infección con 1.5×10^3 TCID₅₀/ml y 7.5×10^2 TCID₅₀/ml de HeV o NiV vivos (combinados con la sG con etiqueta S). Las células se incubaron durante 24 horas, se fijaron en metanol y se marcaron inmunofluorescentemente por la proteína P antes de la microscopía digital y el análisis de imágenes para determinar el área relativa de cada sincitio. La figura muestra el área relativa sincitial (pixel²) frente a la concentración de la sG con etiqueta S para el HeV (círculos) y el NiV (triángulos).

La Figura 12 muestra la estructura lineal de la proteína sG.

La Figura 13 muestra una estructura tridimensional de la proteína sG.

La Figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína sG (Sec. con núm. de ident.: 15).

La Tabla 1 muestra la neutralización de la infección por HeV y NiV. Los antisueros antiproteína G del HeV se generaron en conejos por 3 inoculaciones con la sG con etiqueta S purificada. Los sueros que se colectaron 2 semanas después de la tercera inyección se analizaron en un ensayo de neutralización de virus contra el HeV y el NiV. Los títulos de neutralización de suero se determinaron por la presencia de CPE (indicada por +) y se registraron como la dilución de suero en la que al menos uno de los pocillos duplicados no mostraba CPE.

Descripción de la invención

10 Técnicas generales

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (lo que incluye técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del estado de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tales como, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, y otros, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y CC. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, y otros, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, y otros, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan y otros, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (CA. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies : a practical approach* (P. Shepherd y C Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, "una" glicoproteína G incluye una o más glicoproteínas G.

Generalmente esta divulgación proporciona formas solubles de la proteína de la envoltura de la glicoproteína G del HeV, específicamente oligómeros de monómeros peptídicos solubles del ectodominio de las proteínas G del virus Hendra, y sus usos en un método de vacunación de un sujeto contra la infección por el virus Hendra. Se divulgan también métodos para usar estas proteínas en el diagnóstico, la detección y el tratamiento. Específicamente, esta invención proporciona oligómeros de monómeros peptídicos solubles del ectodominio de las proteínas de la envoltura de la glicoproteína G de HeV que retienen características de la glicoproteína G viral nativa lo que permite una rápida producción de alto rendimiento de vacunas, diagnósticos y cribado.

Los monómeros peptídicos solubles de las glicoproteínas G del HeV comprenden todo o parte del ectodominio (p. ej., extracelular) de la glicoproteína G de un HeV y generalmente se producen al suprimir todo o parte del dominio transmembrana de la glicoproteína G y todo o parte de la cola citoplasmática de la glicoproteína G. A modo de ejemplo, la glicoproteína G soluble puede comprender el ectodominio completo de una glicoproteína G del HeV. Adicionalmente a modo de ejemplo, y no como limitación un monómero peptídico soluble puede comprender todo o parte del ectodominio y parte del dominio transmembrana de una glicoproteína G del HeV.

Los monómeros peptídicos del HeV solubles conservan una o más características de la glicoproteína viral nativa correspondiente, tales como, capacidad para interactuar o unirse al receptor de la célula huésped viral, pueden producirse en forma o formas oligoméricas, o la capacidad de inducir anticuerpos (lo que incluye, pero no se limita a, anticuerpos neutralizantes virales) capaces de reconocer la glicoproteína G nativa. Ejemplos de características adicionales incluyen, pero no se limitan a, la capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped. Puede utilizarse una metodología convencional para evaluar las glicoproteínas G del HeV solubles en cuanto a una o más de las características. Ejemplos de metodologías que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, los ensayos que se describen en la presente descripción en los Ejemplos.

50 Polinucleótidos

El término polinucleótido se usa ampliamente y se refiere a nucleótidos poliméricos de cualquier longitud (p. ej., oligonucleótidos, genes, RNA inhibidores pequeños, fragmentos de polinucleótidos que codifican una proteína etc.). A

modo de ejemplo, los polinucleótidos pueden comprender todo o parte del ectodominio o todo o parte del ectodominio y parte del dominio transmembrana. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, lineal, circular, superenrollado, monocatenario, bicatenario, ramificado, parcialmente bicatenario o monocatenario. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados. Generalmente los polinucleótidos codifican para todo o parte del ectodominio (p. ej., extracelular) de la glicoproteína G de un HeV.

Ejemplos no limitantes de secuencias que pueden usarse para construir un monómero peptídico de la glicoproteína G del HeV soluble pueden encontrarse en Wang, L.F. y otros, J. Virol. 74 (21), 9972-9979 (2000) y Yu, M. y otros, Virology 251 (2), 227-233 (1998). Ejemplos no limitantes de secuencias que pueden usarse para construir una glicoproteína G del NiV soluble pueden encontrarse en Harcourt, BH y otros, Virology 271: 334-349, 2000 y Chua, K.B. y otros, Science 288 (5470), 1432-1. Generalmente, las secuencias de la glicoproteína G de cualquier aislamiento o cepa de virus Hendra puede utilizarse para derivar los polinucleótidos y polipéptidos.

A modo de ejemplo, y no como limitación, un polinucleótido que codifica un monómero peptídico soluble de la glicoproteína G del HeV comprende una secuencia polinucleotídica que codifica los aminoácidos 71 al 604 de la secuencia de aminoácidos de una Glicoproteína G del HeV en Wang, LF y otros, J. Virol. 74 (21), 9972-9979 (2000) (ver, además, p. ej., Yu, M. y otros, Virology 251 (2), 227-233 (1998)). También se divulga en la presente descripción un polinucleótido que codifica una glicoproteína G del HeV soluble que puede comprender los nucleótidos del 9048 a 10727 de la secuencia polinucleotídica de una glicoproteína G del HeV en Wang, L.F. y otros, J. Virol. 74 (21), 9972-9979 (2000) (ver, además, p. ej., Yu, M. y otros, Virology 251 (2), 227-233 (1998)).

También se divulga en la presente descripción un polinucleótido que codifica una glicoproteína G del NiV soluble puede comprender una secuencia polinucleotídica que codifica aproximadamente los aminoácidos del 71 al 602 de la secuencia de aminoácidos de una Glicoproteína G del NiV en Harcourt, BH y otros, Virology 271: 334-349, 2000 (ver, además, Chua, K. B. y otros, Science 288 (5470), 1432-1). También se divulga en la presente descripción un polinucleótido que codifica una glicoproteína G del NiV soluble que puede comprender los nucleótidos del 9026 al 10696 de la secuencia polinucleotídica de una glicoproteína G del HeV en Harcourt, BH y otros, Virology 271: 334-349, 2000 (ver, además, Chua, K. B. y otros, Science 288 (5470), 1432-1).

Los equivalentes funcionales de estos polinucleótidos también se divulgan en este documento. A modo de ejemplo y no como limitación los polinucleótidos funcionalmente equivalentes codifican una glicoproteína G soluble de un HeV o NiV y poseen una o más de las siguientes características: capacidad de interaccionar o unirse al receptor de la célula huésped viral, pueden producirse en forma o formas oligoméricas, la capacidad de provocar anticuerpos (lo que incluye, pero no se limita a, anticuerpos neutralizantes virales) capaces de reconocer la glicoproteína G nativa y/o la capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped.

Las secuencias de polinucleótidos que son funcionalmente equivalentes pueden identificarse, además, por métodos que se conocen en la técnica. Una variedad de programas de softwares de alineación de secuencias está disponible en la técnica para facilitar la determinación de homología o equivalencia. Ejemplos no limitantes de estos programas son los programas de familia BLAST que incluyen BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX (BLAST está disponible en la web mundial en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), FastA, Compare, DotPlot, BestFit, GAP, FrameAlign, ClustalW y PileUp. Estos programas se obtienen comercialmente disponibles en un paquete completo de software de análisis de secuencias como GCG Inc.'s Wisconsin Package. Otros programas de análisis y alineación similares pueden adquirirse de diversos proveedores tales como el MegAlign de DNA Star, o los programas de alineación en GeneJockey. Alternativamente, puede accederse a los programas de análisis de secuencias y de alineación a través de la world wide web en sitios tales como el CMS Molecular Biology Resource en sdsc.edu/ResTools/cmsbp.html. Puede utilizarse cualquier bases de datos de secuencias que contenga secuencias de ADN o de proteína correspondientes a un gen o un segmento de este para el análisis de secuencia. Las bases de datos comúnmente empleadas incluyen, pero no se limitan a, GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SWISS-PROT, EST, STS, GSS, y HTGS.

Los parámetros para determinar el grado de homología establecidos para uno o más de los programas de alineación antes mencionados se conocen bien en la técnica. Estos incluyen pero no se limitan al valor de p, porcentaje de identidad de secuencia y el porcentaje de similitud de secuencia. El valor de P es la probabilidad de que la alineación se produzca por casualidad. Para una única alineación, el valor de p puede calcularse de acuerdo con Karlin y otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 2246. Para las alineaciones múltiples, el valor de p puede calcularse mediante el uso de un enfoque heurístico tal como el programado en el BLAST. El porcentaje de identificación de secuencia se define por la relación del número de nucleótidos o aminoácidos coincidentes entre la secuencia de consulta y la secuencia conocida cuando las dos se alinean óptimamente. El porcentaje de similitud de secuencia se calcula de la misma manera que el porcentaje de identidad excepto porque puntúan como positivos al calcular el porcentaje de similitud aminoácidos que son diferentes pero similares. Así, los cambios conservadores que se producen frecuentemente sin alterar la función, tales como un cambio de un aminoácido básico a otro similar o un cambio de un aminoácido hidrofóbico a otro similar se puntúan como si fueran idénticos.

Polipéptidos

Los monómeros peptídicos solubles (también denominados aquí como polipéptidos) del ectodominio de la glicoproteína G del HeV comprende los aminoácidos del 71 al 604 de la secuencia de aminoácidos para una glicoproteína G del HeV en Wang, L.F. y otros, J. Virol. 74 (21), 9972-9979 (2000) (ver, además, p. ej., Yu, M. y otros, Virology 251 (2), 227-233 (1998)). El término polipéptido se usa ampliamente en la presente descripción para incluir un péptido o proteína o fragmentos de estos. También se describe en la presente descripción una glicoproteína G del NiV soluble que puede comprender los aminoácidos del 71 al 602 de la secuencia de aminoácidos de una glicoproteína G del NiV en Harcourt, BH y otros, Virology 271: 334-349, 2000 (ver, además, Chua, K. B. y otros, Science 288 (5470), 1432-1).

También se divulgan los equivalentes funcionales de estos polipéptidos. A modo de ejemplo y no como limitación los polipéptidos funcionalmente equivalentes poseen una o más de las siguientes características: capacidad para interactuar o unirse al receptor de la célula huésped viral, la capacidad para inducir anticuerpos (lo que incluye, pero no se limita a, anticuerpos neutralizantes virales) capaces de reconocer la Glicoproteína G nativa y/o la capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped.

También se divulgan los peptidomiméticos, que incluyen péptidos modificados químicamente, moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos que son de origen natural, péptidos y lo similar, y conservan las características de los polipéptidos de la glicoproteína G soluble que se proporcionan en la presente descripción. ("Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery" 5ta ed., vols. 1 al 3 (ed. M. E. Wolff; Wiley Interscience 1995).

También se divulgan en la presente descripción polipéptidos o análogos de estos que tienen sustancialmente la misma función que los polipéptidos. Tales polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, un mutante por sustitución, adición o delección del polipéptido. También se divulgan proteínas o péptidos que son sustancialmente homólogos a los polipéptidos. En la técnica se dispone de una variedad de programas de software de alineación de secuencias que se describen en la presente descripción anteriormente para facilitar la determinación de homología o equivalencia de cualquier proteína a una proteína divulgada aquí.

El término "análogo" incluye cualquier polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos sustancialmente idéntica a un polipéptido divulgada aquí en la que uno o más residuos se sustituyen conservativamente con un residuo funcionalmente similar y que muestra los aspectos funcionales de los polipéptidos como se describen en la presente descripción. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrofóbico) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro similar, la sustitución de un residuo polar (hidrofílico) por otro similar tal como de entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro similar, o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico u otro.

La expresión "sustitución conservativa" incluye, además, el uso de un residuo químicamente derivatizado en lugar de un residuo no derivatizado. "Derivado químico" se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más residuos químicamente derivatizados por reacción de un grupo lateral funcional. Ejemplos de tales moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres se derivatizaron para formar hidrocloruros de amina, grupos p-toluensulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno imidazólico de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencil-histidina. Se incluyen como derivados químicos, además, aquellas proteínas o péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: 4-hidroxi prolina puede sustituirse por prolina; 5-hidroxis lisina puede sustituirse por lisina; 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; La homoserina puede sustituirse por serina; Y la ornitina puede sustituir a la lisina. Los polipéptidos también incluyen cualquier polipéptido que tenga una o más adiciones y/o supresiones o residuos con relación a la secuencia de uno cualquiera de los polipéptidos cuyas secuencias se describen en la presente descripción.

Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para obtener la correspondencia máxima como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente mediante al comparar las secuencias mediante una ventana de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en la presente descripción, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, usualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente.

La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede realizarse mediante el uso del programa Megalign en el conjunto de Lasergene de softwares de bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, WI), mediante el uso de los parámetros que se establecen por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research

Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pág. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pág. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) del 20 por ciento o menos, usualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que se observa un residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, mediante la división del número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y la multiplicación de los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Vectores de Expresión

También se divulgan presente descripción vectores de expresión que comprenden al menos un polinucleótido que codifica una proteína de la glicoproteína G soluble descrita en la presente descripción. Los vectores de expresión se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a vectores o plásmidos virales. Los vectores basados en virus para la entrega de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Vehículos basados en virus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (ver, p. ej., las Publicaciones del PCT núm. WO 90/07936, WO 94/03622, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de los EE.UU. núms. 5,219,740 and 4,777,127), vectores basados en alfavirus (p. ej., vectores del virus de Sindbis, virus del bosque Semliki), virus del Río Ross, vectores de virus adenoasociados (AAV) (ver, p. ej., las Publicaciones del PCT núms. PCT Publication Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 and WO 95/00655), virus vaccinia (p. ej., virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) o viruela aviar), sistema recombinante de Baculovirus y virus del herpes.

Los vectores no virales, tales como los plásmidos, se conocen bien también en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, plásmidos basados en levaduras y bacterias.

Los métodos para introducir los vectores en una célula huésped y aislar y purificar la proteína expresada se conocen bien en la técnica también (p. ej., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, y otros, 1989) Cold Spring Harbor Press). Ejemplos de células huésped incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero, tales como células HeLa y CHO.

A modo de ejemplo el vector que comprende el polinucleótido que codifica la proteína G soluble puede comprender además una secuencia de polinucleótido de la etiqueta para facilitar el aislamiento y/o la purificación. Ejemplos de etiquetas incluyen pero no se limitan al, epitopo myc, etiqueta S, etiqueta his, epitopo de HSV, epitopo V5, FLAG y CBP. Dichas etiquetas están comercialmente disponibles o se preparan fácilmente por métodos que se conocen en la técnica.

El vector puede comprender además una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia enlazadora. Generalmente la secuencia de enlace se sitúa en el vector entre la secuencia polinucleotídica de la proteína G soluble y la secuencia polinucleotídica de la etiqueta. Las secuencias de enlace pueden codificar aminoácidos aleatorios o pueden contener sitios funcionales. Ejemplos de secuencias enlazadoras que contienen sitios funcionales incluyen pero no se limitan a, secuencias que contienen el sitio de escisión de la trombina o el sitio de escisión de la enterocinasa.

A modo de ejemplo, y no como limitación, puede generarse una glicoproteína G soluble como se describe en la presente descripción mediante el uso de virus vaccinia recombinantes en un sistema de cultivo de células de mamífero. Ejemplos de cebadores que pueden usarse para amplificar la secuencia de ectodominio deseada a partir de un molde de cDNA del virus Hendra o del virus Nipah, incluyen, pero no se limitan a, los cebadores de los Ejemplos.

Anticuerpos

Ejemplos de anticuerpos divulgados aquí incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos específicos para la glicoproteína G del HeV, anticuerpos específicos para la glicoproteína G del NiV, anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con la glicoproteína G del HeV y la glicoproteína G del NiV y anticuerpos neutralizantes. A modo de ejemplo una característica de un anticuerpo neutralizante incluye, pero no se limita a, la capacidad de bloquear o prevenir la

infección de una célula huésped. Los anticuerpos pueden caracterizarse mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, de simple cadena (ScFv), mutantes de estos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, lo que incluye variantes de glicosilación de los anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos, y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos preferidos se derivan de orígenes murino, de rata, humano, de primate, o cualquier otro origen (lo que incluye anticuerpos quiméricos o humanizados).

Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales y policlonales se conocen bien en la técnica. Los anticuerpos policlonales pueden inducirse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, la lapa de ojo de cerradura, hemocinina, albúmina de suero, tromboglibina bovina, inhibidor de la tripsina de soja, adyuvante de Freund completo y adyuvante MPL-TDM. El protocolo de inmunización puede determinarse por un experto en la técnica.

Los anticuerpos pueden alternativamente ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse al usar métodos de hibridoma (ver, p. ej., Kohler, B. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 o según se modificó por Buck, D. W., y otros, *In Vitro*, 18:377-381 (1982)).

Si se desea, el anticuerpo de interés puede secuenciarse y la secuencia polinucleotídica puede clonarse después en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en el vector en una célula huésped y la célula huésped puede expandirse y congelarse después para uso futuro. En una alternativa, la secuencia polinucleotídica puede usarse por manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo (p. ej., manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener mayor afinidad por la glicoproteína G y/o mayor eficacia en la inhibición de la fusión del virus Hendra o Nipah al receptor de la célula huésped).

Los anticuerpos también pueden humanizarse por métodos conocidos en la técnica. (Ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. núms. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; y 6,180,370). Aun en otra alternativa, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos mediante el uso de ratones comercialmente disponibles que se modificaron genéticamente para expresar proteínas de inmunoglobulinas humanas específicas.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden fabricarse de forma recombinante y expresarse mediante el uso de cualquier método que se conozca en la técnica. A modo de ejemplo, los anticuerpos pueden fabricarse de forma recombinante mediante la tecnología de presentación en fagos. Ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. Núms. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; y 6,265,150; y Winter y otros, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y otros, *Nature* 348: 552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*. La presentación en fagos puede realizarse en una variedad de formatos; para una revisión ver, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). A modo de ejemplo, puede usarse una glicoproteína G soluble como se describe en la presente descripción como antígeno con el propósito de aislar anticuerpos recombinantes mediante estas técnicas.

Los anticuerpos pueden hacerse recombinantemente mediante el aislamiento primero de los anticuerpos y de las células productoras de anticuerpos de los animales huésped, la obtención de la secuencia génica y el uso de la secuencia génica para expresar el anticuerpo recombinantemente en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (p. ej., tabaco) o leche transgénica. Se describieron métodos para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche. Ver, por ejemplo, Peeters, y otros *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. y D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65 (1995); y Pollock, y otros, *J Immunol Methods* 231:147(1999). En la técnica se conocen métodos para fabricar derivados de anticuerpos, p. ej., humanizados, de cadena sencilla, etc.

Los anticuerpos pueden unirse a un vehículo por métodos convencionales, para usarse en, por ejemplo, aislar o purificar glicoproteínas G del Hendra o el Nipah o detectar glicoproteínas G del Hendra o el Nipah en una muestra o espécimen biológico. Alternativamente, a modo de ejemplo, los anticuerpos neutralizantes pueden administrarse como inmunoterapia pasiva a un sujeto infectado con o sospechosos de infectarse con virus Hendra o Nipah. Un "sujeto", incluye pero no se limita a humanos, simios, animales de granja, animales de deporte y mascotas. Los usos veterinarios también se abarcan por la invención.

Diagnósticos

Las glicoproteínas G solubles y/o anticuerpos divulgados pueden usarse en una variedad de inmunoensayos para los virus Hendra y Nipah. Las glicoproteínas G solubles recombinantes expresadas pueden producirse con un control de alta calidad y son adecuadas como antígenos con el propósito de detectar anticuerpos en muestras biológicas. A modo de ejemplo, y no como limitación, una glicoproteína G soluble del HeV o del NiV o combinaciones de estas podrían usarse como antígenos en un ensayo ELISA para detectar anticuerpos en una muestra biológica de un sujeto.

Vacunas

Esta divulgación se refiere, además, a vacunas para los virus Hendra. También se divulga en la presente una vacuna para el virus Nipah. En un ejemplo las vacunas son vacunas basadas en ADN. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena in vivo. Ver, p. ej., las patentes de los EE.UU. núms. 6,436,908; 6,413,942; y 6,376,471. Los vectores basados en virus para la entrega de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica y se describen ejemplos no limitantes en la presente descripción. Las vacunas se basan en proteínas y comprenden uno o más oligómeros de la invención. Los fragmentos preferidos son el ectodominio, y porciones funcionales de este, y además, porciones que son específicamente reactivas a anticuerpos neutralizantes. Las porciones que son reactivas de esta manera se representan en la Figura 14. También se divulgan aquí vacunas basadas en anticuerpos que pueden ser para un tratamiento más inmediato así como para la profilaxis contra la infección.

La administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, lo que incluye la inyección, administración oral, pistola de partículas o administración cateterizada, y administración tópica. Puede usarse, además, la entrega dirigida de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de entrega de DNA mediadas por un receptor se describen en, por ejemplo, Findeis y otros, *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou y otros, *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y otros, *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu y otros, *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:3655; Wu y otros, *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338.

Pueden emplearse, además, vehículos y métodos de entrega no virales, lo que incluye, pero no se limita a, el ADN condensado policatiónico enlazado o no enlazado a un adenovirus muerto solo (ver, p. ej., *Curiel, Hum. Gene Ther.* (1992) 3: 147); DNA enlazado a un ligando (ver, p. ej., Wu, *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 16985); células de vehículos de entrega de células eucariotas (ver, p. ej., la patente de los EE.UU. 5,814,482, las Publicaciones del PCT núms. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y la fusión o neutralización de carga nucleica con las membranas celulares. Puede emplearse, además, ADN desnudo. Los métodos ilustrativos de introducción de DNA desnudo se describen en la Publicación del PCT Núm. WO 90/11092 y en la Patente de los EE.UU. núm. 5,580,859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de entrega de genes se describen en la Patente de los EE.UU. núm. 5,422,120; las Publicaciones del PCT núms. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, *Mol. Cell Biol.* (1994) 14:2411, y en Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:1581.

Para la administración humana, los codones que comprenden el polinucleótido que codifica una glicoproteína G soluble pueden optimizarse para uso humano.

También se divulga aquí una glicoproteína G del HeV o NiV soluble o combinación de las mismas para uso como una vacuna de subunidades. La glicoproteína G soluble del HeV o NiV o combinación de las mismas puede administrarse por sí misma o en combinación con un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, saponina, QuilA y derivados, iscoms, liposomas, citocinas lo que incluye interferón gamma o interleucina 12, DNA, microencapsulación en una partícula sólida o semisólida, adyuvante completo e incompleto de Freund o ingredientes activos de este, lo que incluye muramil dipéptido y análogos, DEAE dextrano/aceite mineral, Alhidrogel, adyuvante Auspharm, y Algamulina.

La vacuna de subunidades que comprende HeV soluble puede administrarse oralmente, intravenosamente, subcutáneamente, intraarterialmente, intramuscularmente, intracardialmente, intraespinalmente, intratorácicamente, intraperitonealmente, intraventricularmente, sublingualmente y/o transdérmicamente.

La dosificación y el esquema de administración pueden determinarse por métodos que se conocen en la técnica. La eficacia de la glicoproteína G soluble del HeV o el NiV o combinaciones de estas como una vacuna para los virus Hendra, Nipah o Henipavirus relacionados puede evaluarse, además, por métodos que se conocen en la técnica.

Composiciones farmacéuticas

la composición farmacéutica de la invención comprende el oligómero de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Aquí se describen también composiciones que comprenden los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos que pueden comprender además estabilizadores, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables que se conocen en la técnica (Remington: *The Science and practice of Pharmacy*, 20va Ed. (2000) Lippincott Williams y

- Wilkins, Ed. KE Hoover.), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones, y pueden comprender soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes lo que incluye ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos lo que incluye glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Excipientes farmacéuticamente aceptables se describen adicionalmente en la presente descripción.

- Las composiciones de la invención generalmente comprenden, el oligómero de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune para mitigar la infección, aliviar un síntoma de infección y/o prevenir la infección.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además agentes adicionales que sirven para mejorar y/o complementar el efecto deseado. A modo de ejemplo, para potenciar la inmunogenicidad del oligómero de la invención que se administra como una vacuna de subunidad, la composición farmacéutica puede comprender además un adyuvante. En la presente descripción se proporcionan ejemplos de adyuvantes.

- También a modo de ejemplo, y no como limitación, si se administra un oligómero de la invención para aumentar la respuesta inmune en un sujeto infectado o sospechoso de infectarse con Hendra y/o si se administran los anticuerpos como una forma de inmunoterapia pasiva la composición puede comprender, además, por ejemplo, otros agentes terapéuticos (p. ej., agentes antivirales)

Estuches de diagnóstico

- Se divulgan aquí estuches de diagnóstico para uso en los métodos divulgados. Los estuches incluyen uno o más recipientes que comprenden a manera de ejemplo y no de limitación polinucleótidos que codifican una glucoproteína G de HeV o G de NiV soluble o combinaciones de las mismas, una glucoproteína G de HeV o G de NiV soluble o combinaciones de las mismas y/o anticuerpos e instrucciones para el uso de conformidad con cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.
- Generalmente, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración o instrucciones para la realización de un ensayo. Los envases pueden ser dosis unitarias, envases a granel (p. ej., envases multidosis) o dosis de subunidades. Las instrucciones suministradas en los estuches son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o inserto del envase (p. ej., una hoja de papel incluida en el estuche), pero son aceptables, además, las instrucciones legibles por máquina (p. ej., instrucciones en un disco de almacenamiento óptico o magnético).
- Los estuches se encuentran en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, botellas, tarros, envases flexibles (p. ej., bolsas de Mylar o plástico selladas), y lo similar. Se contemplan, además, paquetes para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (p. ej., un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. El estuche puede tener un puerto de acceso (por ejemplo, el recipiente puede ser un vial o una bolsa de la solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente puede contener, además, un puerto de acceso (por ejemplo, el recipiente puede ser un vial o bolsa de la solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Los estuches pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como soluciones amortiguadoras e información interpretativa. Normalmente, el estuche comprende un recipiente y una etiqueta o inserto(s) del recipiente en o asociado con el recipiente.
- Los siguientes ejemplos ilustran sólo ciertas y no todas las modalidades de la invención, y así, no deben considerarse limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcciones del vector

- Los vectores se construyeron para expresar las proteínas G del HeV o del NiV con la cola de transmembrana/citoplásmica eliminada. Los cDNAs clonados de la proteína G del HeV o del NiV de longitud completa se amplificaron mediante PCR para generar fragmentos de aproximadamente 2600 pb que codificaban la proteína G del HeV con el dominio transmembrana/cola citoplásmica eliminada.

Se sintetizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de la proteína G del HeV. sHGS: 5'-GTCGACCAACCATGCAAAATTACACCAGAACGACTGATAAT-3' (Sec. con núm. de ident.: 1). sHGAS: 5'-GTTTAAACGTCGACCAATCAACTCTCTGAACATTG GGCAGGTATC-3'. (Sec. con núm. de ident.: 2)

- 5 Los siguientes oligonucleótidos cebadores se sintetizaron para la amplificación de la proteína G del NiV. sNGS: 5'-CTCGAGCACCATGCAAAATTACACAAGATCAACAGACAA-3' (Sec. con núm. de ident.: 3). sNGAS: 5'-CTCGAGTAGCAGCCGGATCAAGCTTATGTACATT GCTCTGGTATC-3'. (Sec. con núm. de ident.: 4)

10 Todas las reacciones de PCR se realizaron mediante el uso de la DNA polimerasa Accupol (PGS Scientifics Corp., Gaithersburg, MD) con las siguientes configuraciones: 94 °C por 5 minutos inicialmente y después 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 2 minutos, 72 °C por 4 minutos; 25 ciclos. Estos cebadores generaron un producto de PCR para el ORF de la proteína G del sHeV flanqueado por los sitios *Sal* 1 y la proteína el ORF de la proteína G del sNiV flanqueada por sitios *Xho* 1. Los productos de PCR se purificaron en gel (Qiagen, Valencia, CA). Después de la purificación en gel, las proteínas G del sHeV y del sNiV se subclonaron en un vector TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

15 Se adquirió el PSecTag2B (Invitrogen Corp.) y se modificó para contener una etiqueta del péptido S o una etiqueta del epitopo myc. Se sintetizaron oligonucleótidos solapados que codificaban la secuencia para el péptido S y los extremos salientes digeridos por *EcoR*1 y *Kpn* 1. SPEPS: 5'-CAAGGAGACCGCTGCTGCTAAGTTCGAACGCCAGCACATGGATT CT-3' (Sec. con núm. de ident.: 5) SPEPAS: 5'-AATTAGAATCCATGTGCTGGCGTTTGAAGTT AGCAGCAGCGGTCTCCTTGGTAC-3'. (Sec. con núm. de ident.: 6)

Se sintetizaron los oligonucleótidos solapantes que codificaban la secuencia para la etiqueta del epitopo myc y los extremos salientes digeridos por *Kpn*1 y *EcoR*1.

- 20 MTS: 5'-CGAACAAAAGCTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3' (Sec. con núm. de ident.: 7). MTAS 5'-AATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGCTTTTGTTCGGTAC-3'. (Sec. con núm. de ident.: 8)

25 Se mezclaron 64 pmol de SPEPS y 64 pmol de SPEPAS y se calentaron a 65 °C por 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 por 5 minutos y se enfriaron lentamente hasta 50 °C. Las dos mezclas se diluyeron y se clonaron en el pSecTag2B digerido con *Kpn*1-*EcoR*1 para generar un pSecTag2B modificado con el péptido S o un pSecTag2B modificado con el epitopo myc. Todas las construcciones se seleccionaron inicialmente por digestión de restricción y se verificaron adicionalmente por secuenciación.

30 La construcción TOPO sG se digirió con *Sal* 1 purificada en gel (Qiagen) y se subclonó en marco en el sitio *Xho* 1 del pSecTag2B modificado con el péptido S o del pSecTag2B modificado con el epitopo myc. Todas las construcciones se seleccionaron inicialmente por digestión de restricción y se verificaron adicionalmente por secuenciación.

35 Las construcciones Igk líder-péptido-S-s HeVG (sG con etiqueta S) y Igk líder-etiqueta myc-sHeVG (sG con etiqueta myc) se subclonaron en el vector lanzadera vaccinia pMCO2 [Carroll, 1995]. SEC. de oligonucleótidos: 5'-TCGACCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTA-3' (Sec. con núm. de ident.: 9) se sintetizó y se usó en combinación con el oligonucleótido sHGAS para amplificar por PCR la sG con etiqueta S y la sG con etiqueta myc. Todas las reacciones de PCR se realizaron mediante el uso de la ADN polimerasa Accupol (PGS Scientifics Corp.) con las siguientes configuraciones: 94 °C por 5 minutos inicialmente y después 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 2 minutos, 72 °C por 4 minutos; 25 ciclos. Estos cebadores generaron productos de PCR flanqueados por sitios *Sal* 1. Los productos de PCR se purificaron en gel (Qiagen). Después de la purificación en gel, se subclonaron la sG con etiqueta S y la sG con etiqueta myc en un vector TOPO (Invitrogen Corp.). La sG con etiqueta S y la sG con etiqueta myc se digirieron con *Sal* 1 y subclonaron en el sitio *Sal* 1 del pMCO2. Todas las construcciones se seleccionaron inicialmente por digestión de restricción y se verificaron adicionalmente por secuenciación. Las estructuras polipeptídicas de la sG con etiqueta S del HeV y de la sG con etiqueta myc del HeV se representan en un dibujo representativo en la Figura 6.

Ejemplo 2: Producción de las proteínas de la proteína G soluble

45 Para la producción de proteínas las construcciones genéticas se usaron para generar vectores de poxvirus recombinantes (virus vaccinia, cepa WR). El poxvirus recombinante se obtuvo después mediante el uso de técnicas estándar que empleaban la selección tk y la tinción GUS (6). Brevemente, las células CV-1 se transfectaron con la fusión pMCO2 sHeV G o la fusión pMCO2 sNiV G mediante el uso de un estuche de transfección de fosfato de calcio (Promega, Corp., Madison, WI). Estas monocapas se infectaron después con la cepa tipo salvaje Western Reserve (WR) del virus vaccinia a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.05 PFU/célula. Después de 2 días los precipitados de células se recolectaron como reservas de virus recombinantes crudas. Se infectaron células TK con las existencias crudas recombinantes en presencia de 25 µg/ml de 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (Calbiochem, La Jolla, CA). Después de 2 horas el virus se reemplazó con una capa de EMEM-10 que contenía 1 % de agarosa de bajo punto de fusión (LMP)(Life Technologies, Gaithersburg, MD) y 25µg/ml de BrdU. Después de 2 días de incubación, se añadió

una capa adicional de EMEM-10 que contenía 1 % de agarosa LMP, 25 µg/ml de BrdU y 0.2 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico (X-GLUC) (Clontech, Palo Alto, CA). En 24-48 horas las placas azules fueron evidentes, se seleccionaron y se sometieron a dos rondas más de doble selección de la placa de purificación. Los virus vaccinia recombinantes vKB16 (fusión de proteína G del sHeV) y vKB22 (fusión de proteína G del sNiV) se amplificaron después y se purificaron por métodos estándar. Brevemente, los virus vaccinia recombinantes se purifican mediante la purificación de placas, amplificación en cultivos celulares, sedimentación con cojín de sacarosa en una ultracentrífuga y titulación mediante ensayo en placa. La expresión de la proteína G del sHeV se verificó en lisados celulares y sobrenadantes de cultivo (Figura 1).

Como se muestra en la Figura 1, el virus vaccinia que codifica una proteína G del HeV soluble con etiqueta S o etiqueta myc se produjo por marcaje metabólico en células HeLa. El control es la proteína G del HeV de tipo salvaje. La precipitación específica de cada construcción sG se muestra por precipitación a partir de lisados o sobrenadantes mediante el uso de MAb para myc o perlas S.

Ejemplo 3: Propiedades de la proteína G soluble

Para demostrar que la proteína G expresada recombinante, soluble, purificada (sHeV G) conservaba las propiedades deseables (p. ej., características estructurales nativas tales como la competencia de unión al receptor), se demostró que la preincubación de células objetivo con la proteína G del sHeV purificada por afinidad resulta en una inhibición dependiente de la dosis de la fusión mediada por virus en varias líneas celulares diferentes que son susceptibles a la infección y fusión mediada por el virus (Figura 2).

Para la purificación de las glicoproteínas G solubles, se infectaron células HeLa con vKB15 o vKB16 (moi=3) por 2 horas. Después de la infección el virus se eliminó y se añadió medio OptiMem libre de suero (Invitrogen, Corp.). Después de 36 horas, los sobrenadantes se eliminaron y se clarificaron por centrifugación. Se vertió en una columna de proteína S 15 ml de agarosa de proteína S (Novagen) en una columna XK26 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La columna de proteína S se lavó con 10 volúmenes de lecho de PBS. El sobrenadante de las células infectadas con vKB16 se pasó por la columna de agarosa de proteína S, la columna se lavó con 10 volúmenes de lecho de PBS, y se eluyó la proteína sG con etiqueta S con 1 volumen de lecho de citrato 0.2 M pH=2 en 20 ml de Tris 1 M PH=8. Se adquirió Sefarosa B de lectina de lenteja (Amersham Pharmacia Biotech) y se vertió en una columna XK26 de 25 ml. Los sobrenadantes de las células infectadas con vKB15 se pasaron por la columna de lectina de lentejas, la columna se lavó con 10 volúmenes de lecho de PBS, y la proteína sG con etiqueta myc se eluyó con 1 volumen de lecho de glicina 0.2M pH=2.5 en 2 ml de Tris 1M pH=8. Ambos eluatos se concentraron después mediante el uso de unidades de filtro centrífugo Centricon de 30 kDa (Millipore, Billerica, MA) y se esterizaron por filtración. Las concentraciones de proteína se calcularon mediante el uso de una SDS/PAGE, tinción con Coomassie R-250 azul brillante y análisis de densitometría con el software NIH image 1.62.

Como se muestra en la Figura 2, la glicoproteína de la envoltura G del HeV soluble (ya sea la versión con la etiqueta S o la versión con a etiqueta myc) bloquea tanto la fusión de células a célula mediada por el HeV y por el NiV. La inhibición de la respuesta a la dosis de la fusión de células a células por el HeV y el NiV se llevó a cabo mediante la preincubación de las células objetivo con la cantidad indicada de sG purificada durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron células efectoras que expresan las proteínas f y G del HeV o el NiV y se permitió que la fusión prosiguiera por 2.5 h a 37 °C. Las mezclas de reacción se procesaron en cuanto a la producción de β-gal mediante el uso del ensayo del gen reportero β-gal. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los paneles A y B muestran que el sobrenadante que contiene la proteína G del sHeV (con etiqueta S) crudo puede bloquear potentemente la fusión mediada por el HeV en dos tipos de células alternantes, mientras que un sobrenadante de control de células infectadas con el WR (virus vaccinia no recombinante infectado) no tiene efecto. Paneles C y D: Inhibición de la fusión mediada por el HeV y el NiV por la proteína sG con etiqueta S en células U373 (Panel C) o células PCI 13 (Panel D). Paneles E y F: Inhibición de la fusión mediada por HeV y NiV por la sG con etiqueta myc purificada en células U373 (Panel E) o células PCI 31 (Panel F).

Como evidencia adicional, se realizó una inmunofluorescencia indirecta que demostró que la proteína G del sHeV puede unirse específicamente a líneas celulares que son susceptibles a la fusión e infección mediada por virus (Figura 3). La proteína G del sHeV es incapaz de unirse a células HeLa, una línea celular no permisiva para la fusión e infección viral mediada por el HeV y el NiV. Estos datos sugieren que la proteína G del sHeV inhibe la fusión mediada por el HeV por unión al receptor putativo sobre las células objetivo, con lo que bloquea la unión y fusión subsiguientes de las células efectoras que expresan las proteínas G y F del HeV. La interacción de la proteína G del sHeV con el receptor de HeV putativo puede ser una herramienta útil para la purificación e identificación de receptores. Dado que la glicoproteína G soluble puede expresarse y purificarse y que exhibe, además, características bioquímicas similares a las que se esperaría de la glicoproteína G nativa esto la hace un inmunógeno de subunidades ideal para la obtención de anticuerpos neutralizantes del virus. Se construyó una construcción de la sG similar mediante el uso del mismo enfoque de la etiqueta S (ver métodos anteriores) mediante el uso de la secuencia codificante de la glicoproteína de la envoltura G del virus Nipah. Esta proteína G del sNiV (con etiqueta S) se clonó y expresó y se muestra en la Figura 4.

Se realizó un análisis final de la glicoproteína de la envoltura G del sHeV con etiqueta S para evaluar la naturaleza oligomérica predicha de la proteína. La retención de algunas propiedades oligoméricas de una glicoproteína G soluble y secretada puede ser importante para retener características inmunológicas o bioquímicas críticas como se discute en la introducción anterior. La Figura 5 muestra un análisis de la glicoproteína G del sHeV con etiqueta S secretada por fraccionamiento con gradiente de sacarosa que identifica formas monoméricas, diméricas y tetraméricas de la glicoproteína G. Se analizaron tanto materiales reticulados como no reticulados. Los resultados indican que la proteína sG monomérica, dimérica y alguna tetramérica comprende la preparación de sG, y esto está de acuerdo con los hallazgos en versiones solubles y de longitud completa de otras glicoproteínas de unión H y HN de los paramixovirus (que se discuten anteriormente). Estas tres especies podrían separarse por técnicas de cromatografía preparativa de exclusión por tamaño si se desea.

Ejemplo 4: Caracterización de la proteína G del HeV soluble y secretada

Se buscó a continuación determinar si la sG secretada era de naturaleza oligomérica. El peso molecular aparente del material de la sG purificada se examinó primero mediante el uso de una cromatografía de exclusión por tamaño con una columna de grado analítico Superdex 200 calibrada 10/300. Se pasó una alícuota de 500 µg de la sG con etiqueta S o de sG con etiqueta myc por la Superdex 200 y se recolectaron las fracciones mediante el uso de los mismos métodos empleados para los estándares de alto peso molecular. Se observaron resultados esencialmente idénticos con las glicoproteínas sG con etiqueta S y etiqueta myc, y los resultados que se muestran en la Figura 7 son los de la sG con etiqueta S. En la figura se indican las ubicaciones de los patrones de proteínas y de las tres especies principales de sG. El recuadro muestra el perfil de la sG separado. El análisis de la sG con etiqueta S purificada en siete experimentos independientes de separación indicó dos picos principales con pesos moleculares aparentes de ~372 KDa +/- 19 KDa (~60 % del material) y ~261 KDa +/- 47 KDa (~35 % del material), y un pico menor de ~ 741 KDa +/- 40 KDa (~5 % del material). Estos resultados indicaron que al menos parte del material sería de naturaleza oligomérica, consistente con la estructura esperada de la glicoproteína. Sin embargo, a partir de la experiencia previa en la preparación y análisis de glicoproteínas solubles de membrana derivadas de virus, tales como la gp120 del HIV-1, tales cálculos de peso molecular derivados del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño pueden sobreestimarse.

Para caracterizar adicionalmente las especies oligoméricas aparentes de la sG, se analizó la sG con etiqueta S mediante el uso de la densitometría de gradiente de sacarosa. Para este análisis, se escogió la glicoproteína sG con etiqueta S porque puede precipitarse por afinidad con agarosa de proteína S y evita la necesidad de un MAb específico. La Figura 8 representa los perfiles oligoméricos de la proteína G con etiqueta S marcada metabólicamente aislada del sobrenadante de las células que se expresan. Después de una breve centrifugación para eliminar cualquier desecho celular se concentró el sobrenadante y se sustituyó la solución amortiguadora por PBS como se describe en la presente descripción. Antes de la separación en el gradiente de sacarosa, la mitad del sobrenadante se reticuló con DTSSP, un reticulante reducible, y el material reticulado y no reticulado se cargó en dos gradientes separados de sacarosa. Después del fraccionamiento de cada gradiente, las fracciones se dividieron en 2 tubos, se precipitaron con agarosa de proteína S, se lavaron y se resuspendieron en solución amortiguadora de muestra de SDS, un conjunto con y un conjunto sin β-mercaptoetanol y los cuatro conjuntos de fracciones se analizaron después por SDS-PAGE. Las Figuras 8A y 8B son proteínas sG con etiqueta s no reticuladas separadas en gradiente de sacarosa, fraccionadas, e inmunoprecipitadas. En la Figura 8A, las fracciones se separaron en SDS-PAGE en ausencia de β-mercaptoetanol, mientras que en la Figura 8B, las fracciones se separaron en SDS-PAGE en presencia de β-mercaptoetanol. Las Figuras 8C y 8D son proteínas sG con etiqueta S reticuladas separadas en el gradiente de sacarosa, fraccionadas, e inmunoprecipitadas. En la Figura 8C, las fracciones se separaron en SDS-PAGE en ausencia de β-mercaptoetanol, mientras que en la Figura 8D, las fracciones se separaron en SDS-PAGE en presencia de β-mercaptoetanol. El material de partida para cada gradiente también se puso en cada gel en presencia o ausencia de β-mercaptoetanol y se ilustra como control. A partir de los datos mostrados en las Figuras 8A y 8C, se determinó que para la proteína G con etiqueta S no reticulada y reticulada hay tres especies distintas de sG presentes. Basados en los pesos moleculares aparentes de la sG en cada una de las fracciones a través de cada uno de los gradientes, estas tres especies representan probablemente un monómero, dímero y tetrámero. Además, la reticulación inmediata de la sG con DTSSP antes de la centrifugación en gradiente no aumentó significativamente la cantidad de las especies tetraméricas o diméricas. El análisis de la sG no reticulada, no reducida y reducida indica claramente que el oligómero dimérico se une por disulfuro, lo que se anticipó con base en datos derivados de otras glicoproteínas de unión de los paramixovirus (36, 44). Se demostró que los dímeros de otras glicoproteínas de unión de los paramixovirus forman un tetrámero en la superficie de las células infectadas, y generalmente se cree que la estructura oligomérica nativa es un dímero de dímeros. Para analizar esta posibilidad aquí, se expresó la proteína G del HeV de longitud completa y se marcó metabólicamente en células HeLa (una línea celular negativa para el receptor) y se realizó un experimento similar y un análisis de gradiente de sacarosa. Después de un procedimiento de reticulación, o sin tratamiento, de la proteína G del HeV expresada en la superficie en células intactas, las células se lisaron con un detergente no iónico, se clarificaron los lisados por centrifugación, y las preparaciones de proteína G del HeV expresadas en la superficie se analizaron mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. Las fracciones se analizaron por inmunoprecipitación con sueros de conejo policlonales antiHeV seguidos por Sefarosa de proteína G y se separaron en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras como antes. En la Figura 9 se muestra el análisis de gradiente de sacarosa de la proteína G de HeV radiomarcada de longitud completa no reticulada expresada en la superficie. Aquí se observa

que en las fracciones no reducidas, >95 % de la proteína G del HeV de longitud completa existe como la especie tetramérica aparente (Figura 9A, carriles 2-5) y esta especie oligomérica depende claramente de los enlaces disulfuro como se ilustra por las correspondientes fracciones reducidas que son monoméricas (Figura 9B, carriles 2-5). Además, se observaron perfiles de gradiente de sacarosa idénticos independientemente de si se utilizó o no el reactivo de reticulación lo que indica que las formas de la mproteína G expresadas en la superficie celular nativa forman un oligómero tetramérico muy estable. El dominio de anclaje a la membrana natural de la proteína y su cola citoplasmática pueden contribuir a esta estabilidad. Sin embargo, la mayoría (~ 60-70 %) del producto de la glicoproteína sG con etiqueta S que se produce aquí es un dímero oligomérico lo que indica que puede retener características estructurales nativas importantes y útiles.

Ejemplo 5: Inhibición de la infección por HeV y NiV por la proteína G del HeV soluble.

Se evaluó a continuación si la proteína sG con etiqueta S produce efectos sobre la infección por virus vivo de células Vero en el cultivo. En este caso, después de la preincubación de células Vero con diversas concentraciones de la proteína sG con etiqueta S, las células se infectaron con 1.5×10^3 TCID₅₀/ml y 7.5×10^2 TCID₅₀/ml de HeV o NiV vivos, respectivamente, en presencia de la proteína sG con etiqueta S por 30 min, seguido por la eliminación del inóculo del virus y la incubación con la proteína sG con etiqueta S. Después de 24 horas en cultivo, el número de focos de infección por HeV y NiV se cuantificó por inmunotinción específica de monocapas celulares con una antifosfoproteína (P) como se detalla en los métodos. Ejemplos representativos de células Vero infectadas en presencia o ausencia de la proteína sG con etiqueta S se muestran en la Figura 10. Típicamente, la infección de células Vero con HeV o NiV vivos produce morfologías de sincitios características para cada virus. La inmunofluorescencia para la proteína P del HeV en sincitios por HeV demostró que el HeV infecta de forma reproducible e incorpora las células circundantes en cada sincitio con núcleos celulares y proteínas virales igualmente detectables en la mayoría de las células infectadas (Figura 10A). Las células infectadas con NiV inicialmente muestran una apariencia similar a los sincitios por HeV, pero finalmente los núcleos incorporados dentro de cada célula gigante son secuestrados juntos hacia la periferia mientras que los restos celulares restantes se disponen, además, alrededor del exterior y deja la región central en gran parte vacía. Así, la inmunofluorescencia para la proteína P del HeV en los sincitios por NiV a menudo aparece como esferas huecas recubiertas de antígeno viral (Figura 10B) y por comparación, las infecciones de HeV de control no tratadas producen sincitios más pequeños en relación con el control de NiV no tratado (Figuras 10A y 10B). Las figuras 10C y 10D son ejemplos representativos de células Vero infectadas con HeV y NiV en presencia de 100 µg/ml de la proteína sG con etiqueta S. Aunque todavía había algunas células infectadas presentes como se detecta por inmunofluorescencia, la formación de sincitios se bloqueó completamente en las células infectadas con el HeV y con el NiV (Figuras 10C y 10D, respectivamente). Además, el análisis cuantitativo de la inhibición de la infección por HeV y NiV por la glicoproteína sG con etiqueta S purificada reveló una respuesta dependiente de la dosis, lo que demuestra además su especificidad, como se muestra en la Figura 11. Juntos estos datos proporcionan una fuerte evidencia de que el HeV y el NiV utilizan un receptor común en la superficie de la célula huésped. Adicionalmente, la inhibición específica de ambos virus mediante la proteína sG con etiqueta S demostró, además, que la construcción de la proteína sG con etiqueta S mantiene importantes elementos estructurales nativos. Curiosamente, la infección por HeV se inhibió significativamente mejor que la del NiV de modo que la IC₅₀ determinada para la proteína sG con etiqueta S fue cuatro veces mayor para el NiV (13.20 µg/ml) que para el HeV (3.3 µg/ml) (Figura 11). Dada la evidencia actual que sugiere que ambos virus utilizan un receptor común, las razones de las diferencias observadas en la inhibición por la proteína sG con etiqueta S de la infección por virus frente a la fusión celular permanecen desconocidas. No se observó una diferencia similar en la capacidad de la proteína sG con etiqueta S para inhibir la fusión celular mediada por el HeV y el NiV, como se demuestra en la Fig. 3. Aunque la fusión mediada por el HeV fue más potente que la fusión mediada por el NiV, lo que se ilustra por los niveles más altos de rotación del sustrato, la IC₅₀ con la proteína sG con etiqueta S en ambos ensayos de fusión celular permaneció constante. En informes anteriores, se demostró mediante función heterotípica que la diferencia en las tasas de fusión celular entre el HeV y el NiV dependía de la proteína de fusión. Aquí, se demuestra que la infección natural por el NiV parece ser más vigorosa que la infección por el HeV. Tal vez otras proteínas virales presentes durante la infección influyen en la cinética de la infección lo que altera así la susceptibilidad a la inhibición, o pueden existir diferencias en la afinidad de la proteína sG del HeV frente a la proteína G del NiV por el receptor expresado en la superficie celular.

Ejemplo 6: La proteína G del HeV soluble induce una potente respuesta de anticuerpos policlonales neutralizantes del virus.

Con pocas excepciones, son las glicoproteínas de la envoltura del virus a las que prácticamente se dirigen todos los anticuerpos neutralizantes y todas las vacunas virales humanas exitosas inducen anticuerpos neutralizantes que pueden reaccionar de forma cruzada con cepas inmunológicamente relevantes de un virus. Más específicamente, los anticuerpos neutralizantes del virus son el mecanismo protector principal inducido por vacunas en el caso de los paramixovirus de la parotiditis y el sarampión, y se demostró que las glicoproteínas de la envoltura del NiV de longitud completa expresadas en el virus vaccinia pueden provocar anticuerpos neutralizantes del virus. Los datos indican que la glicoproteína sG con etiqueta S retiene características estructurales importantes basadas en sus capacidades para unirse específicamente a las células positivas a los receptores y bloquear la fusión e infección mediadas por el HeV y el NiV. Así, la inmunización de animales con la sG debería potencialmente generar potentes anticuerpos neutralizantes del virus. Para probar esta posibilidad, se utilizó la proteína sG con etiqueta S purificada para inmunizar conejos y el

antisuero antiG resultante se evaluó en ensayos de neutralización de virus con el HeV y el NiV. La Tabla 1 resume la neutralización de la infección por HeV y NiV por los sueros policlonales anti G de conejo. Los sueros de ambos conejos eran capaces de una neutralización completa del HeV a una dilución de 1: 1280. El NiV también se neutralizó mediante el antisuero de la proteína sG con etiqueta S, con neutralización completa a una dilución de 1:640. Una diferencia de dos veces en el título es consistente con la reactividad cruzada parcial del anticuerpo de las glicoproteínas G del HeV y el NiV. Se comprobaron, además, presangrados de ambos conejos en cuanto a su capacidad para neutralizar el HeV y el NiV. Aunque hubo una ligera neutralización a la concentración más alta, esta actividad se anuló completamente tras la dilución de los sueros. Estudios previos demostraron que los antisueros contra el HeV y el NiV se neutralizan cruzadamente, con cada suero ligeramente menos eficaz contra el virus heterotípico (14). Además, se demostró una tendencia similar en la neutralización cruzada mediante el uso del ensayo de fusión celular para el HeV y el NiV (4,81). Debido a que la proteína sG con etiqueta S fue capaz de inducir una respuesta inmune tan potente con altos niveles de anticuerpos neutralizantes, esta puede proporcionar una vía para las estrategias de desarrollo de vacunas.

Referencias citadas

1. Anonymous. 1999. From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of Hendra-like virus Malaysia and Singapore, 1998-1999. *Jama* 281:1787-8.
2. Baker, K. A., R. E. Dutch, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky. 1999. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 3:309-19.
3. Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
4. Bossart, K. N., L.F. Wang, B. T. Eaton, and C. C. Broder. 2001. Functional expression and membrane fusion tropism of the envelope glycoproteins of Hendra virus. *Virology* 290:121-35.
5. Bossart, K. N., L. F. Wang, M. N. Flora, K. B. Chua, S. K. Lam, B. T. Eaton, y C. C. Broder. 2002. Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the nipah virus and hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol* 76:11186-98.
6. Broder, C. C, y P. L. Earl. 1999. Recombinant vaccinia viruses. Design, generation, and isolation. *Mol Biotechnol* 13:223-45.
7. Broder, C. C, P. L. Earl, D. Long, S. T. Abedon, B. Moss, y R. W. Doms. 1994. Antigenic implications of human immunodeficiency virus type 1 envelope quaternary structure: oligomer-specific and -sensitive monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11699-703.
8. Chan, D. C, D. Fass, J. M. Berger, y P. S. Kim. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-73.
9. Chen, L., P. M. Colman, L. J. Cosgrove, M. C. Lawrence, L. J. Lawrence, P. A. Tulloch, y J. J. Gorman. 2001. Cloning, expression, and crystallization of the fusion protein of Newcastle disease virus. *Virology* 290:290-9.
10. Chen, L., J. J. Gorman, J. McKimm-Breschkin, L. J. Lawrence, P. A. Tulloch, B. J. Smith, P. M. Colman y M. C. Lawrence. 2001. The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Structure (Camb)* 9:255- 66.
11. Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, W. Shieh, C. S. Goldsmith, D. J. Gubler, J. T. Roehrig, B. Eaton, A. R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A. E. Ling, C. J. Peters, L. J. Anderson, y B. W. Mahy. 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288:1432-5.
12. Chua, K. B., K. J. Goh, K. T. Wong, A. Kamarulzaman, P. S. Tan, T. G. Ksiazek, S. R. Zaki, G. Paul, S. K. Lam, y C. T. Tan. 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia [ver comentarios]. *Lancet* 354:1257-9.
13. Citovsky, V., P. Yanai, y A. Loyter. 1986. The use of circular dichroism to study conformational changes induced in Sendai virus envelope glycoproteins. A correlation with the viral fusogenic activity. *J Biol Chem* 261:2235-9.
14. Crameri, G., L. F. Wang, C. Morrissy, J. White, y B. T. Eaton. 2002. A rapid immune plaque assay for the detection of Hendra and Nipah viruses and anti-virus antibodies. *J Virol Methods* 99:41-51.

15. Crennell, S., T. Takimoto, A. Portner, y G. Taylor. 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol* 7:1068-74.
16. Doms, R. W., R. Lamb, J. K. Rose, y A. Helenius. 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 193:545-562.
- 5 17. Doms, R. W., y J. P. Moore. 2000. HIV-I membrane fusion. *Targets Of opportunity. J Cell Biol* 151:F9-F14.
18. Doms, R. W., y D. Trono. 2000. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield [In Process Citation]. *Genes Dev* 14:2677-88.
19. Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, y C. D. Richardson. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75:295-305.
- 10 20. Dutch, R. E., R. N. Hagglund, M. A. Nagel, R. G. Paterson, y R. A. Lamb. 2001. Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology* 281:138-50.
21. Fass, D., S. C. Harrison, y P. S. Kim. 1996. Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat Struct Biol* 3:465-9.
- 15 22. Field, H., P. Young, J. M. Yob, J. Mills, L. Hall, y J. Mackenzie. 2001. The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3:307-14.
23. Goh, K. J., C. T. Tan, N. K. Chew, P. S. Tan, A. Kamarulzaman, S. A. Sarji, K. T. Wong, B. J. Abdullah, K. B. Chua, y S. K. Lam. 2000. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia [see comments]. *N Engl J Med* 342:1229-35.
- 20 24. Halpin, K., P. L. Young, H. Field, y J. S. Mackenzie. 1999. Newly discovered viruses of flying foxes. *Vet Microbiol* 68:83-7.
- 25 25. Halpin, K., P. L. Young, H. E. Field, y J. S. Mackenzie. 2000. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J Gen Virol* 81:1927-1932.
26. Hernandez, L. D., L. R. Hoffman, T. G. Wolfsberg, y J. M. White. 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:627-61.
- 25 27. Hooper, P., S. Zaki, P. Daniels, y D. Middleton. 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3:315-22.
28. Hooper, P. T., H. A. Westbury, and G. M. Russell. 1997. The lesions of experimental equine morbillivirus disease in cats and guinea pigs. *Vet Pathol* 34:323-9.
29. Hughson, F. M. 1997. Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr Biol* 7:R565-9.
- 30 30. Hunter, E. 1997. Viral entry and receptors, págs. 71-119. In S. H. Coffin, S. H. Hughes, y H. E. Varmus (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
31. Hurtley, S. M., y A. Helenius. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:277-307.
32. Jiang, S., K. Lin, N. Strick, y A. R. Neurath. 1993. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* 365:113.
- 35 33. Joshi, S. B., R. E. Dutch, y R. A. Lamb. 1998. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* 248:20-34.
34. Klenk, H. D., y W. Garten. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2:39-43.
35. Lamb, R. A. 1993. Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. *Virology* 197:1-11.
- 40 36. Lamb, R. A., y D. Kolakofsky. 2001. Paramyxoviridae: The viruses and their replication., p. 1305-1340. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 4 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.

37. Lambert, D. M., S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, R. Medinas, D. E. Davis, T. Bucy, J. Erickson, G. Merutka, y S. R. Petteway, Jr. 1996. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2186-91.
- 5 38. Lee, K. E., T. Umapathi, C. B. Tan, H. T. Tjia, T. S. Chua, H. M. Oh, K. M. Fock, A. Kurup, A. Das, A. K. Tan, y W. L. Lee. 1999. The neurological manifestations of Nipah virus encephalitis, a novel paramyxovirus. *Ann Neurol* 46:428-32.
39. Lim, C. C., Y. Y. Sitoh, F. Hui, K. E. Lee, B. S. Ang, E. Lim, W. E. Lim, H. M. Oh, P. A. Tambyah, J. S. Wong, C. B. Tan, y T. S. Chee. 2000. Nipah viral encephalitis or Japanese encephalitis? MR findings in a new zoonotic disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:455-61.
- 10 40. Markwell, M. A., y C. F. Fox. 1980. Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking. *J Virol* 33:152-66.
41. McGinnes, L. W., K. Gravel, y T. G. Morrison. 2002. Newcastle disease virus HN protein alters the conformation of the F protein at cell surfaces. *J Virol* 76:12622-33.
- 15 42. Middleton, D. J., H. A. Westbury, C. J. Morrissey, B. M. van der Heide, G. M. Russell, M. A. Braun, y A. D. Hyatt. 2002. Experimental nipah virus infection in pigs and cats. *J Comp Pathol* 126:124-36.
43. Morrison, T. G. 1988. Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 10:113-35.
44. Morrison, T. G. 2001. The three faces of paramyxovirus attachment proteins. *Trends Microbiol* 9:103-5.
- 20 45. Mounts, A. W., H. Kaur, U. D. Parashar, T. G. Ksiazek, D. Cannon, J. T. Arokiasamy, L. J. Anderson, y M. S. Lye. 2001. A cohort study of health care workers to assess nosocomial transmissibility of Nipah virus, Malaysia, 1999. *J Infect Dis* 183:810-3.
46. Murray, K., P. Selleck, P. Hooper, A. Hyatt, A. Gould, L. Gleeson, H. Westbury, L. Hiley, L. Selvey, B. Rodwell, y otros. 1995. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268:94-7.
- 25 47. Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, y D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67:6025-32.
48. Nussbaum, O., C. C. Broder, B. Moss, L. B. Stem, S. Rozenblatt, y E. A. Berger. 1995. Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J Virol* 69:3341-9.
49. O'Sullivan, J. D., A. M. Allworth, D. L. Paterson, T. M. Snow, R. Boots, L. J. Gleeson, A. R. Gould, A. D. Hyatt, y J. Bradfield. 1997. Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses. *Lancet* 349:93-5.
- 30 50. Paterson, R. G., M. L. Johnson, y R. A. Lamb. 1997. Paramyxovirus fusion (F) protein and hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein interactions: intracellular retention of F and HN does not affect transport of the homotypic HN or F protein. *Virology* 237:1-9.
51. Plemper, R. K., A. L. Hammond, y R. Cattaneo. 2001. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276:44239-46.
- 35 52. Rapaport, D., M. Ovadia, y Y. Shai. 1995. A synthetic peptide corresponding to a conserved heptad repeat domain is a potent inhibitor of Sendai virus-cell fusion: an emerging similarity with functional domains of other viruses. *Embo J* 14:5524-31.
53. Russell, C. J., T. S. Jardetzky, y R. A. Lamb. 2001. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *Embo J* 20:4024-34.
- 40 54. Russell, R., R. G. Paterson, y R. A. Lamb. 1994. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199:160-8.
55. Scheid, A., y P. W. Choppin. 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57:475-90.

56. Singh, M., B. Berger, y P. S. Kim. 1999. LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins. *J Mol Biol* 290:1031-41.
57. Stone-Hulslander, J., y T. G. Morrison. 1997. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J Virol* 71:6287-95.
- 5 58. Takimoto, T., G. L. Taylor, H. C. Connaris, S. J. Crennell, y A. Portner. 2002. Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *J Virol* 76:13028-33.
59. Takimoto, T., G. L. Taylor, S. J. Crennell, R. A. Scroggs, y A. Portner. 2000. Crystallization of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology* 270:208-14.
60. Tan, C. T., y K. S. Tan. 2001. Nosocomial transmissibility of Nipah virus. *J Infect Dis* 184:1367.
- 10 61. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, y Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-7.
62. Tatsuo, H., N. Ono, y Y. Yanagi. 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75:5842-50.
- 15 63. Wang, L., B. H. Harcourt, M. Yu, A. Tamin, P. A. Rota, W. J. Bellini, y B. T. Eaton. 2001. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3:279-87.
64. Wang, L. F., W. P. Michalski, M. Yu, L. I. Pritchard, G. Crameri, B. Shiell, y B. T. Eaton. 1998. A novel P/V/C gene in a new member of the Paramyxoviridae family, which causes lethal infection in humans, horses, and other animals. *J Virol* 72:1482-90.
- 20 65. Westbury, H. A., P. T. Hooper, S. L. Brouwer, yd P. W. Selleck. 1996. Susceptibility of cats to equine morbillivirus. *Aust Vet J* 74:132-4.
66. Westbury, H. A., P. T. Hooper, P. W. Selleck, y P. K. Murray. 1995. Equine morbillivirus pneumonia: susceptibility of laboratory animals to the virus. *Aust Vet J* 72:278-9.
- 25 67. Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, y T. J. Matthews. 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9770-4.
68. Wild, T. F., y R. Buckland. 1997. Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *J Gen Virol* 78:107-11.
69. Wiley, D. C., y J. J. Skehel. 1987. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* 56:365-394.
- 30 70. Williamson, M. M., P. T. Hooper, P. W. Selleck, L. J. Gleeson, P. W. Daniels, H. A. Westbury, y P. K. Murray. 1998. Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust Vet J* 76:813-8.
71. Wilson, I. A., J. J. Skehel, y D. C. Wiley. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289:366-73.
- 35 72. Wong, S. C., M. H. Ooi, M. N. Wong, P. H. Tio, T. Solomon, y M. J. Cardoso. 2001. Late presentation of Nipah virus encephalitis and kinetics of the humoral immune response. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:552-4.
73. Yao, Q., X. Hu, y R. W. Compans. 1997. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *J Virol* 71:650-6.
74. Young, J. K., R. P. Hicks, G. E. Wright, y T. G. Morrison. 1997. Analysis of a peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion using biological assays, NMR, and molecular modeling. *Virology* 238:291-304.
- 40 75. Young, J. K., D. Li, M. C. Abramowitz, y T. G. Morrison. 1999. Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions. *J Virol* 73:5945-56.

76. Young, P. L., K. Halpin, P. W. Selleck, H. Field, J. L. Gravel, M. A. Kelly, y J. S. Mackenzie. 1996. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg Infect Dis* 2:239-40.

5 77. Yu, M., E. Hansson, J. P. Langedijk, B. T. Eaton, y L. F. Wang. 1998. The attachment protein of Hendra virus has high structural similarity but limited primary sequence homology compared with viruses in the genus Paramyxovirus. *Virology* 251:227-33.

78. Yu, M., E. Hansson, B. Shiell, W. Michalski, B. T. Eaton, y L. F. Wang. 1998. Sequence analysis of the Hendra virus nucleoprotein gene: comparison with other members of the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* 79:1775-80.

10 79. Zhao, X., M. Singh, V. N. Malashkevich, y P. S. Kim. 2000. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14172-7.

80. Zhu, J., C. W. Zhang, Y. Qi, P. Tien, y G. F. Gao. 2002. The fusion protein core of measles virus forms stable coiled-coil trimer. *Biochem Biophys Res Commun* 299:897-902.

81. Bossart, K. N., y C. C. Broder. 2004. Viral glycoprotein-mediated cell fusion assays using vaccinia virus vectors. *Methods Mol. Biol.* 269:309-332.

15

Tabla 1

	HeV		NiV	
Dilución	Conejo 405	Conejo 406	Conejo 405	Conejo 406
1:10	--	--	--	--
1:20	--	--	--	--
1:40	--	--	--	--
1:80	--	--	--	--
1:160	--	--	--	--
1:320	--	--	--	--
1:640	--	--	--	--
1:1,280	--	--	++	- +
1:2,560	--	- +	++	++
1:5,120	--	++	++	++
1:10,240	++	++	++	++
1:20,480	++	++	++	++

Lista de secuencias

<110> THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT
OF MILITARY MEDICINE, INC.

<120> FORMAS SOLUBLES DE LA GLICOPROTEÍNA G DE LOS VIRUS HENDRA Y NIPAH

5 <130> 144004.01820

<140> PCT/US05/24022

<141> 2005-07-07

<150> 60/586,843

<151> 2004-07-09

10 <160> 15

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 40

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 1

gtcgaccacc atgcaaaatt acaccagaac gactgataat 40

20 <210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 2

gtttaaactg cgaccaatca actctctgaa cattgggcag gtatc 45

<210> 3

<211> 39

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3

ctcgagcacc atgcaaaatt acacaagatc aacagacaa 39

5 <210> 4

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 4

ctcgagtagc agccggatca agcttatgta cattgctctg gtatc 45

<210> 5

<211> 46

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 5

20 caaggagacc gctgctgcta agttcgaacg ccagcacatg gattct 46

<210> 6

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 6

aattagaatc catgtgctgg cggtcgaact tagcagcagc ggtctccttg gtac 54

<210> 7

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 7

5 cgaacaaaag ctcatctcag aagaggatct g 31

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 8

aattcagatc ctctctgag atgagctttt gttcggtac 39

<210> 9

15 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 9

tcgacccacc atggagacag acacactcct gcta 34

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 10

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											
			20												

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 11

Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr Lys Leu Gly Thr
1 5 10 15

<210> 12

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 12

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 13

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

25 <210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 14

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

<210> 15

5 <211> 421

<212> PRT

<213> Virus Hendra

<400> 15

ES 2 673 972 T3

Gly₁ Leu Pro Asn₅ Gln Ile Cys Leu Gln₁₀ Lys Thr Thr Ser Thr Ile₁₅ Leu
 Lys Pro Arg₂₀ Leu Ile Ser Tyr Thr₂₅ Leu Pro Ile Asn Arg₃₀ Glu Gly Val
 Cys Ile Thr₃₅ Asp Pro Leu Leu₄₀ Ala Val Asp Asn Gly₄₅ Phe Phe Ala Tyr
 Ser His₅₀ Leu Glu Lys Ile₅₅ Gly Ser Cys Thr Arg Gly₆₀ Ile Ala Lys Gln
 Arg₆₅ Ile Ile Gly Val₇₀ Gly Glu Val Leu Asp Arg₇₅ Gly Asp Lys Val Pro₈₀
 Ser Met Phe Met₈₅ Thr Asn Val Trp Thr₉₀ Pro Pro Asn Pro Ser Thr₉₅ Ile
 His His Cys₁₀₀ Ser Ser Thr Tyr His₁₀₅ Glu Asp Phe Tyr Tyr Thr₁₁₀ Leu Cys
 Ala Val Ser₁₁₅ His Val Gly Asp Pro₁₂₀ Ile Leu Asn Ser Thr₁₂₅ Ser Trp Thr
 Glu Ser₁₃₀ Leu Ser Leu Ile₁₃₅ Arg Leu Ala Val Arg Pro₁₄₀ Lys Ser Asp Ser
 Gly₁₄₅ Asp Tyr Asn Gln₁₅₀ Lys Tyr Ile Ala Ile Thr₁₅₅ Lys Val Glu Arg Gly₁₆₀
 Lys Tyr Asp Lys₁₆₅ Val Met Pro Tyr Gly₁₇₀ Pro Ser Gly Ile Lys Gln₁₇₅ Gly
 Asp Thr Leu₁₈₀ Tyr Phe Pro Ala Val₁₈₅ Gly Phe Leu Pro Arg Thr₁₉₀ Glu Phe
 Gln Tyr₁₉₅ Asn Asp Ser Asn Cys₂₀₀ Pro Ile Ile His Cys₂₀₅ Lys Tyr Ser Lys
 Ala Glu₂₁₀ Asn Cys Arg Leu Ser₂₁₅ Met Gly Val Asn Ser₂₂₀ Lys Ser His Tyr
 Ile₂₂₅ Leu Arg Ser Gly₂₃₀ Leu Leu Lys Tyr Asn₂₃₅ Leu Ser Leu Gly Gly Asp₂₄₀
 Ile Ile Leu Gln₂₄₅ Phe Ile Glu Ile Ala Asp₂₅₀ Asn Arg Leu Thr Ile₂₅₅ Gly
 Ser Pro Ser₂₆₀ Lys Ile Tyr Asn Ser₂₆₅ Leu Gly Gln Pro Val₂₇₀ Phe Tyr Gln
 Ala Ser₂₇₅ Tyr Ser Trp Asp Thr Met₂₈₀ Ile Lys Leu Gly Asp₂₈₅ Val Asp Thr
 Val Asp₂₉₀ Pro Leu Arg Val₂₉₅ Gln Trp Arg Asn Asn Ser₃₀₀ Val Ile Ser Arg
 Pro Gly Gln Ser Gln₃₁₀ Cys Pro Arg Phe Asn₃₁₅ Val Cys Pro Glu Val Cys₃₂₀
 Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Asp Ala Phe Leu Ile Asp Arg Leu Asn Trp

ES 2 673 972 T3

325								330				335			
Val	Ser	Ala	Gly 340	Val	Tyr	Leu	Asn	Ser 345	Asn	Gln	Thr	Ala	Glu 350	Asn	Pro
Val	Phe	Ala 355	Val	Phe	Lys	Asp	Asn 360	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gln 365	Val	Pro	Leu
Ala	Glu 370	Asp	Asp	Thr	Asn	Ala 375	Gln	Lys	Thr	Ile	Thr 380	Asp	Cys	Phe	Leu
Leu 385	Glu	Asn	Val	Ile	Trp 390	Cys	Ile	Ser	Leu	Val 395	Glu	Ile	Tyr	Asp	Thr 400
Gly	Asp	Ser	Val	Ile 405	Arg	Pro	Lys	Leu	Phe 410	Ala	Val	Lys	Ile	Pro 415	Ala
Gln	Cys	Ser	Glu 420	Ser											

REIVINDICACIONES

1. Un oligómero de monómeros peptídicos solubles del ectodominio de la proteína G del virus Hendra, en donde un monómero comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 71-604 de la proteína G del virus Hendra;

en donde un monómero no contiene la secuencia de aminoácidos completa de la proteína G del virus Hendra; y
- 5 en donde un monómero retiene una o más características de una proteína G del virus Hendra nativa seleccionada del grupo que consiste en: capacidad de interactuar con una célula receptora viral, capacidad de provocar una reacción de anticuerpos, capacidad de provocar una reacción de anticuerpos neutralizantes, capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped por el virus Hendra.
- 10 2. El oligómero de la reivindicación 1, en donde un monómero no contiene el dominio transmembrana de la proteína G del virus Hendra nativo.
3. El oligómero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde un monómero no contiene la cola citoplásmica de la proteína G del virus Hendra nativo.
4. El oligómero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido oligomérico es un dímero o un tetramero.
- 15 5. El oligómero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde cada monómero es una proteína de fusión que comprende el ectodominio de la proteína G del virus Hendra unida a un segundo péptido, en donde el segundo péptido es una proteína S-tag myc-tag.
6. Una composición farmacéutica que comprende el oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Un oligómero de monómeros peptídicos solubles del ectodominio de la proteína G del virus Hendra para usar en un método de vacunación de un sujeto contra la infección por virus Hendra, en donde los monómeros son i) monómeros del ectodominio de la proteína G del virus Hendra pero carecen de todo o parte del dominio transmembrana y la totalidad o parte de la cola citoplásmica; ii) comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 71-604 de la proteína G del virus Hendra; y iii) retienen una o más características de una proteína G del virus Hendra nativa
- 25 seleccionada del grupo que consiste en: capacidad de interactuar con una célula receptora del huésped viral, capacidad de provocar una reacción de anticuerpos, capacidad de provocar una reacción de anticuerpos neutralizantes, capacidad de bloquear o prevenir la infección de una célula huésped por el virus Hendra.

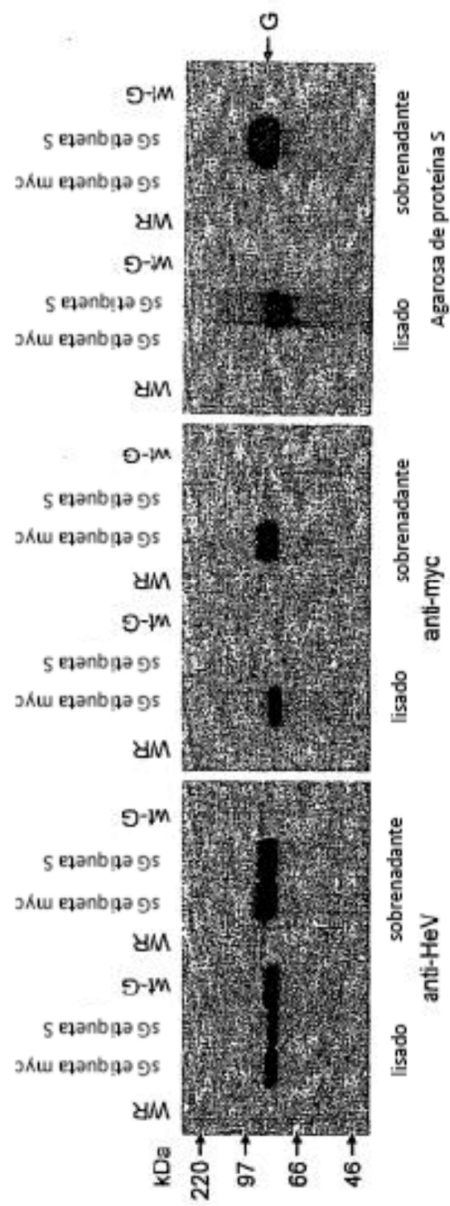
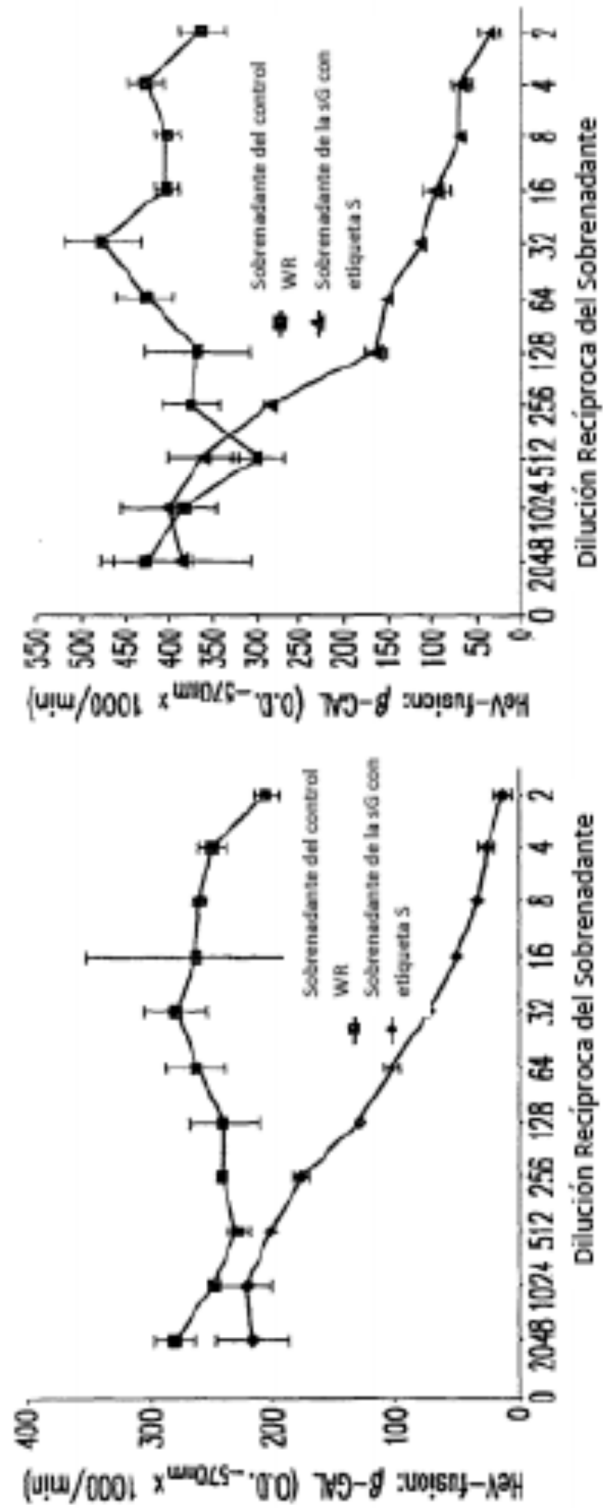


FIG.1



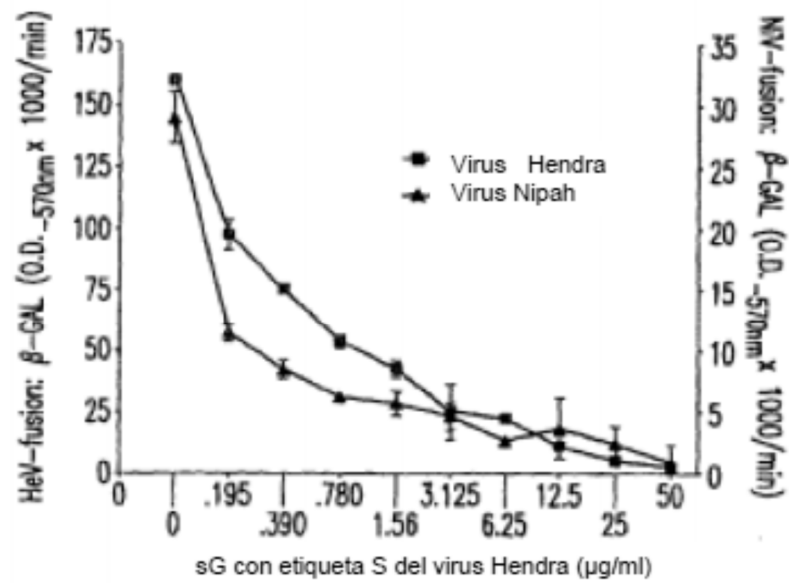


FIG. 2C

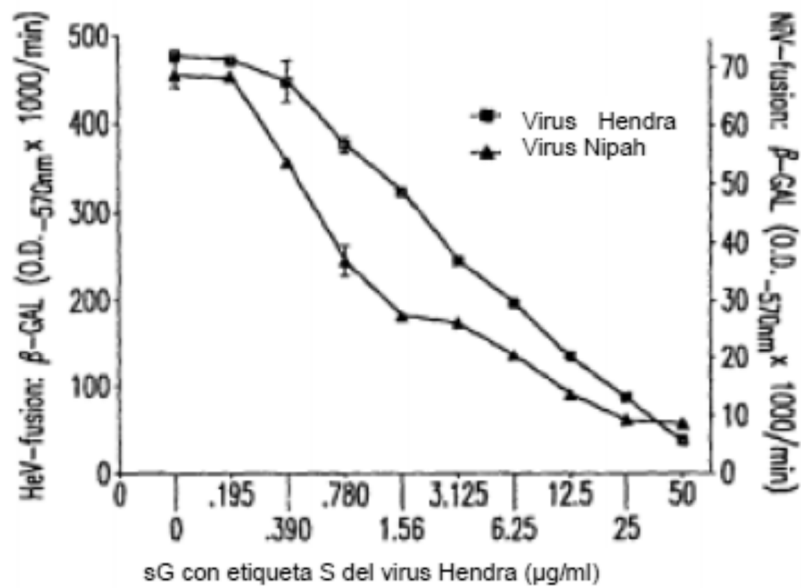


FIG. 2D

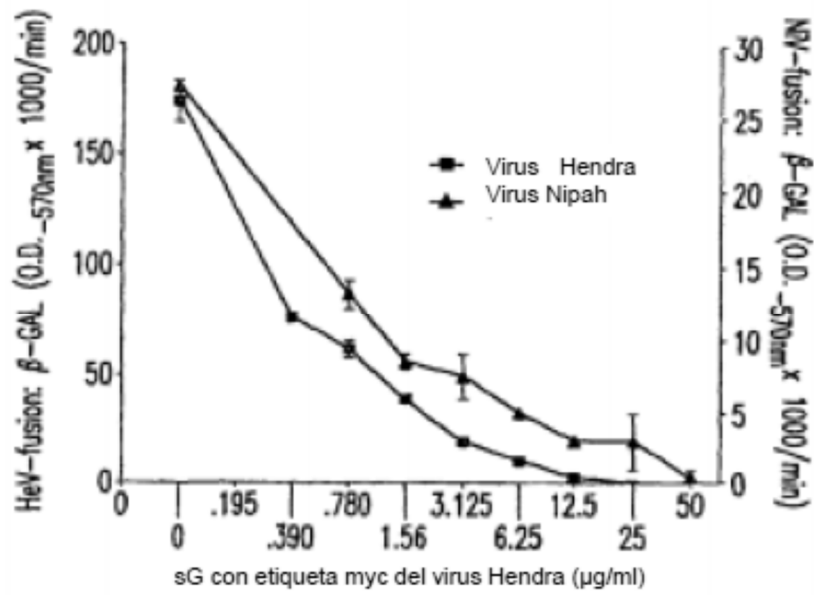


FIG. 2E

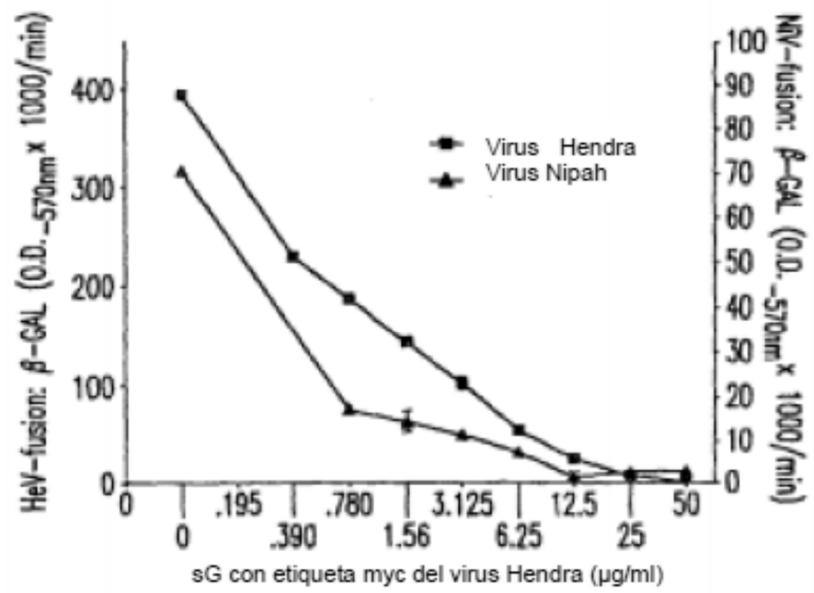


FIG. 2F

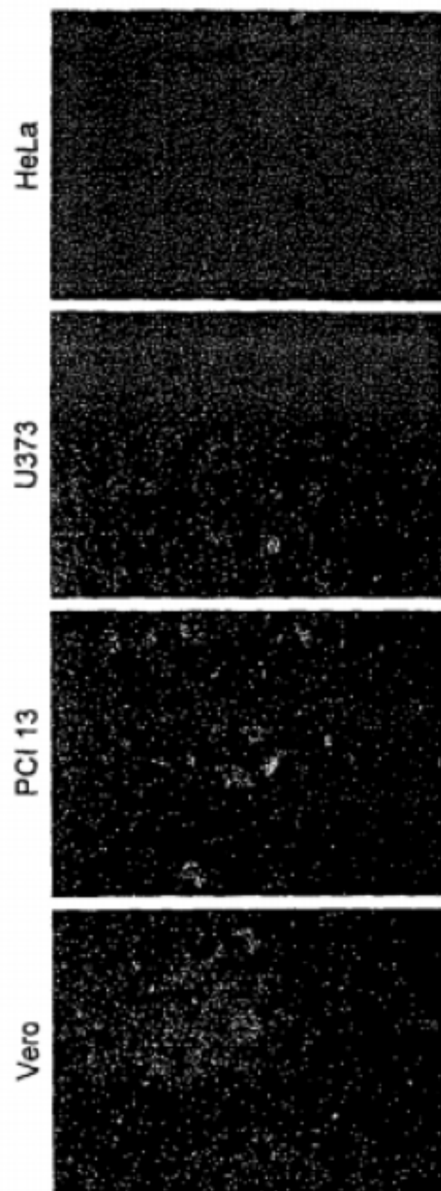


FIG.3A

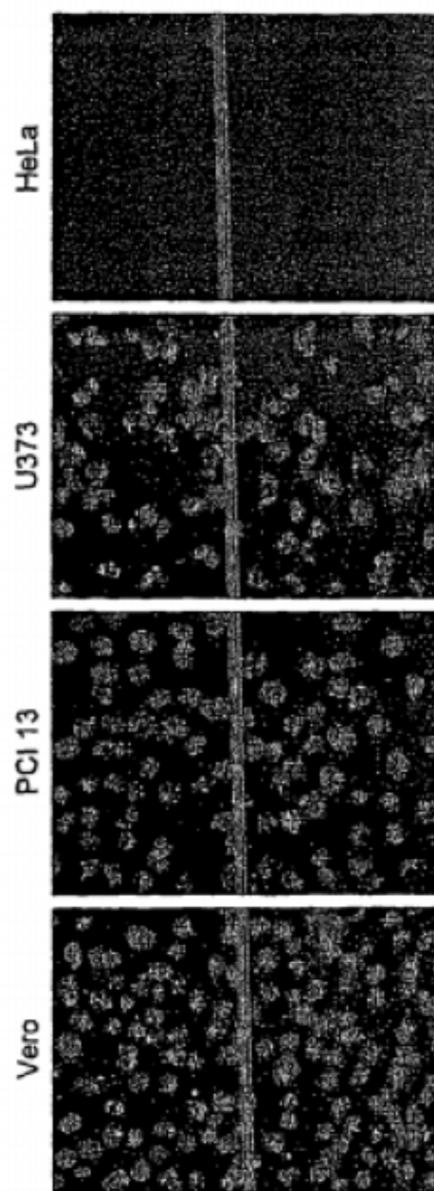


FIG.3B

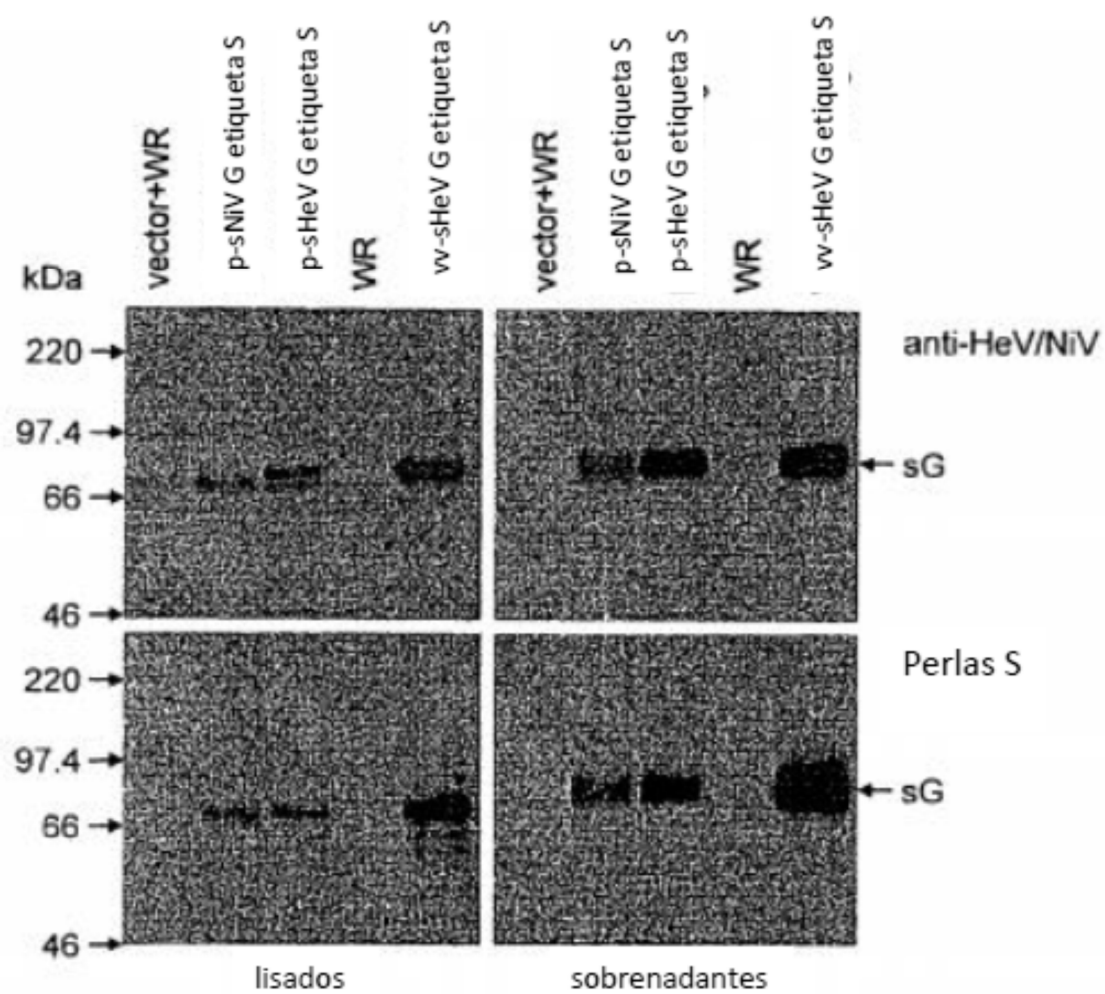


FIG.4

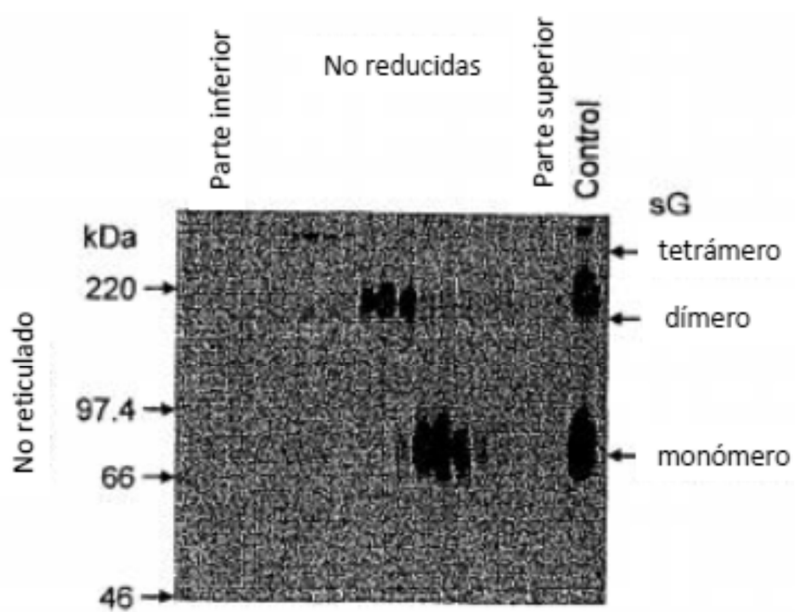


FIG.5A

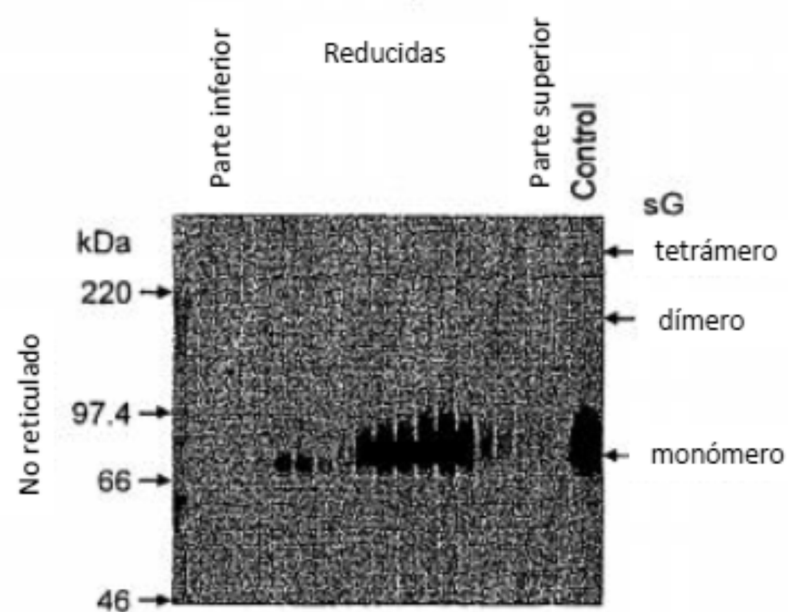


FIG.5B

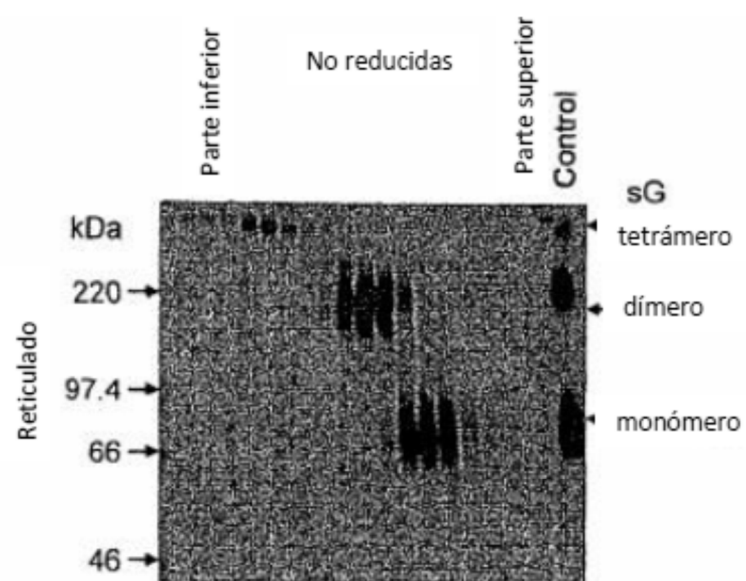


FIG.5C

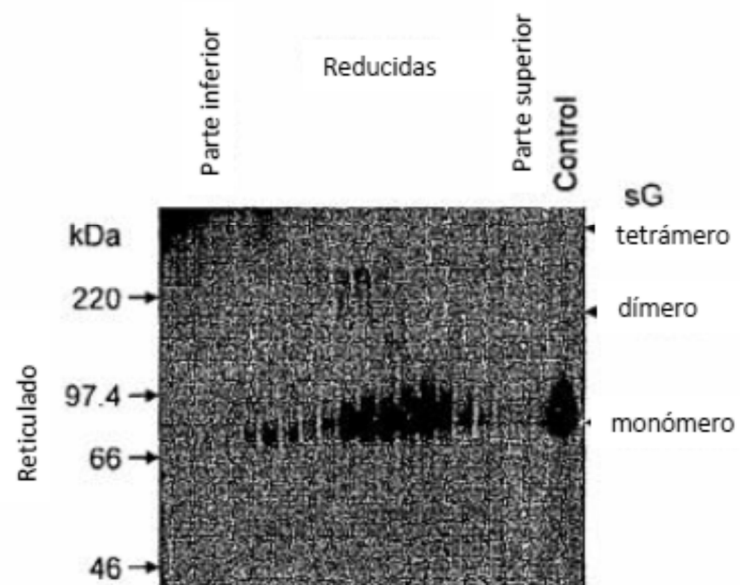


FIG.5D

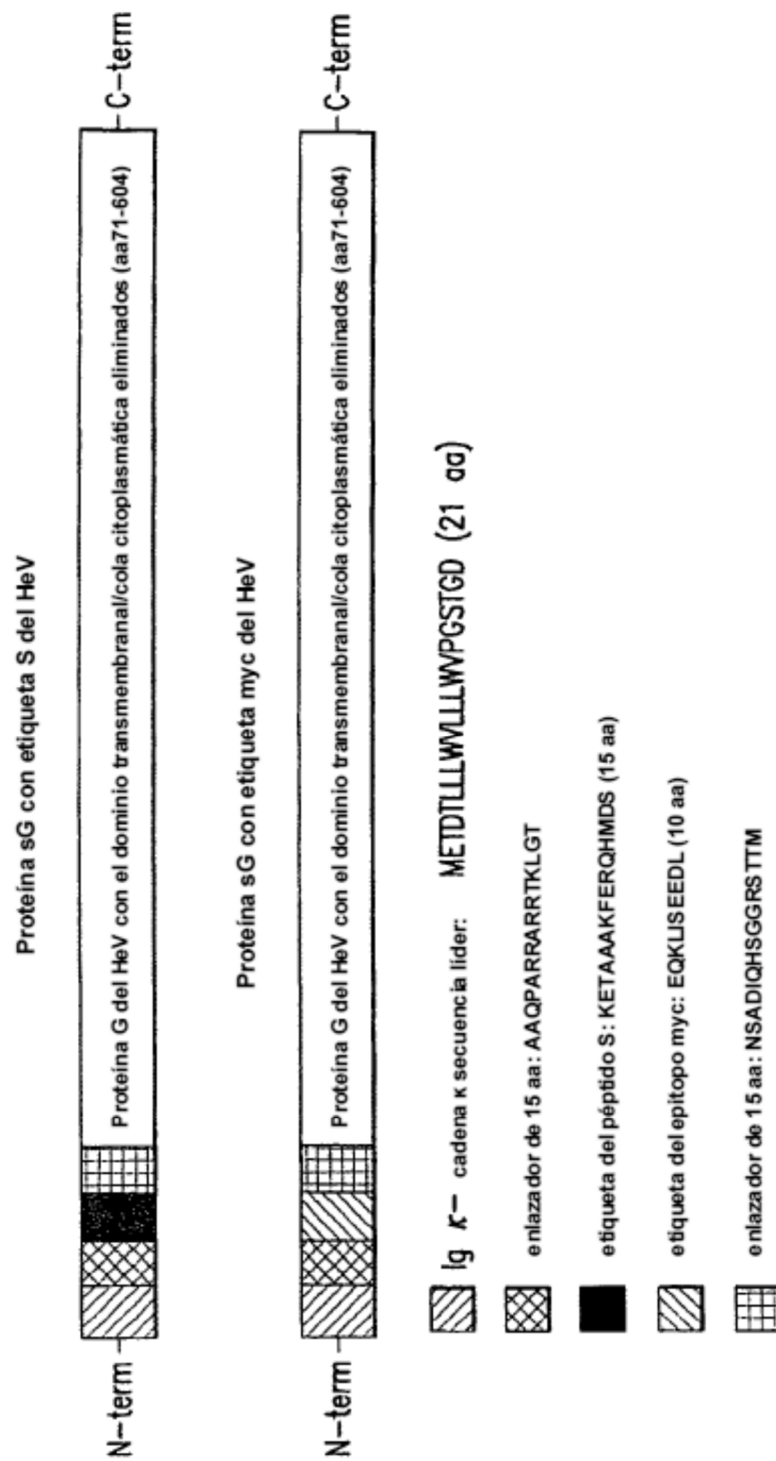
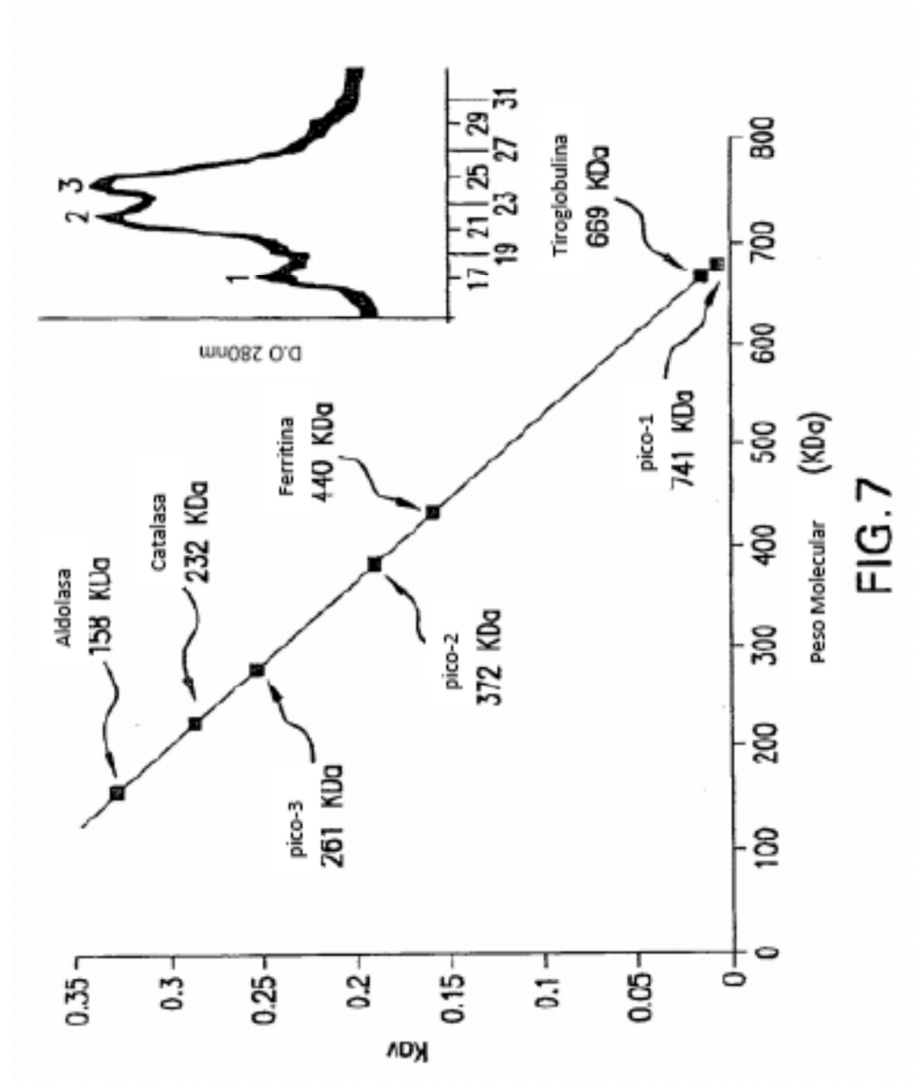


FIG. 6



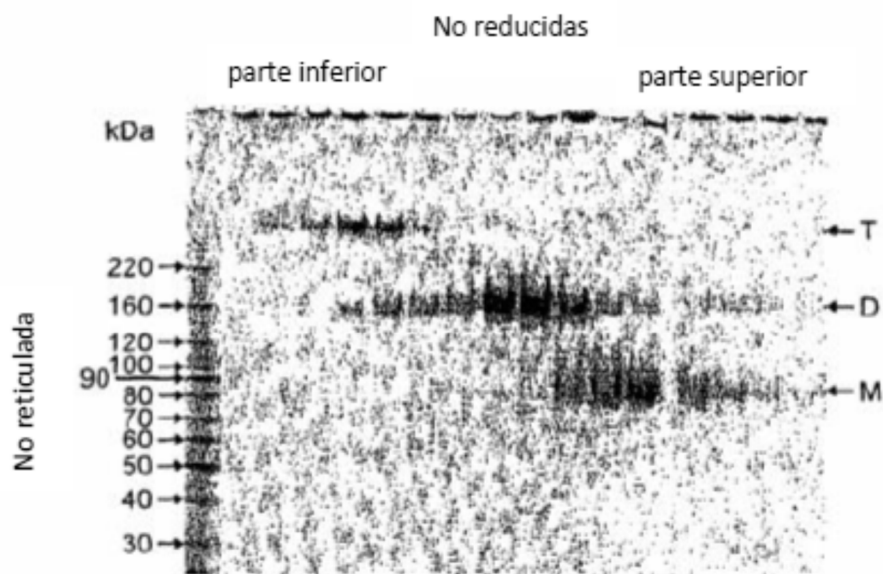


FIG.8A

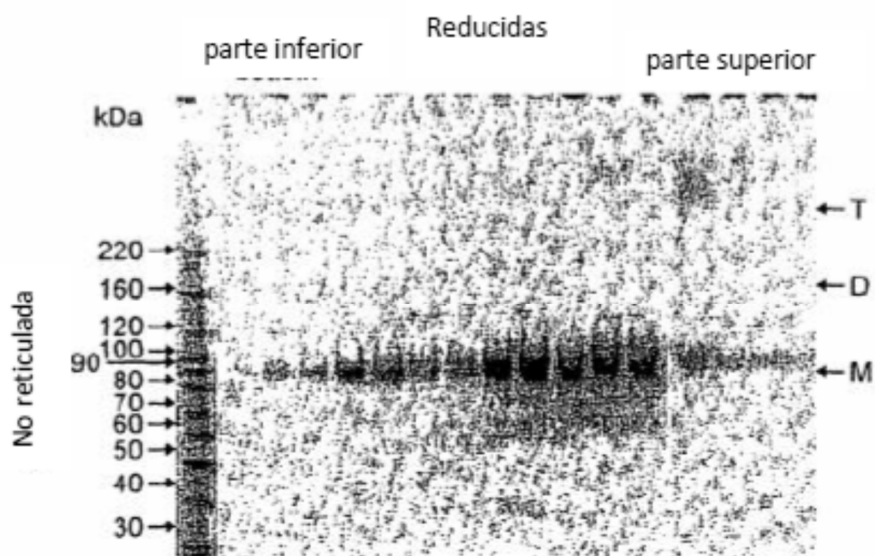
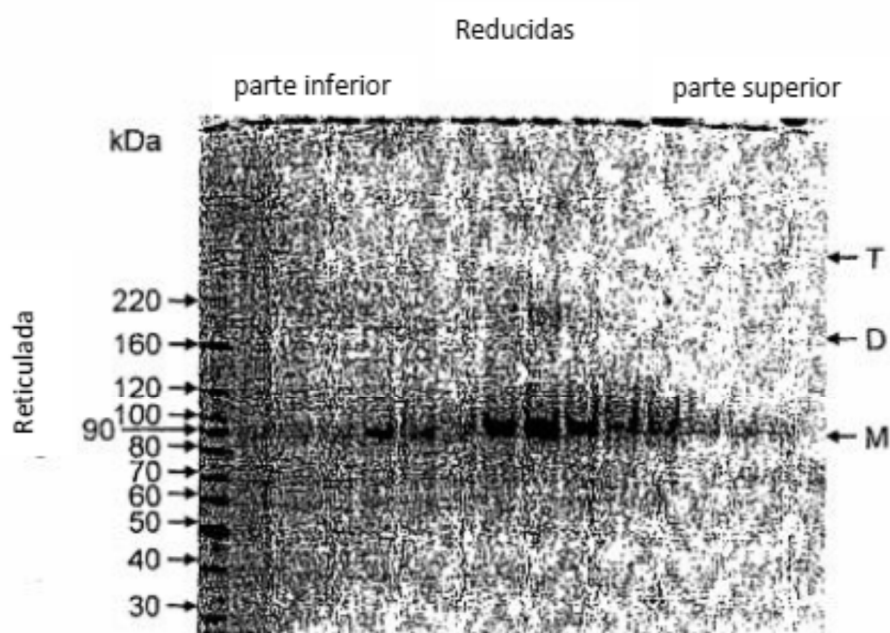
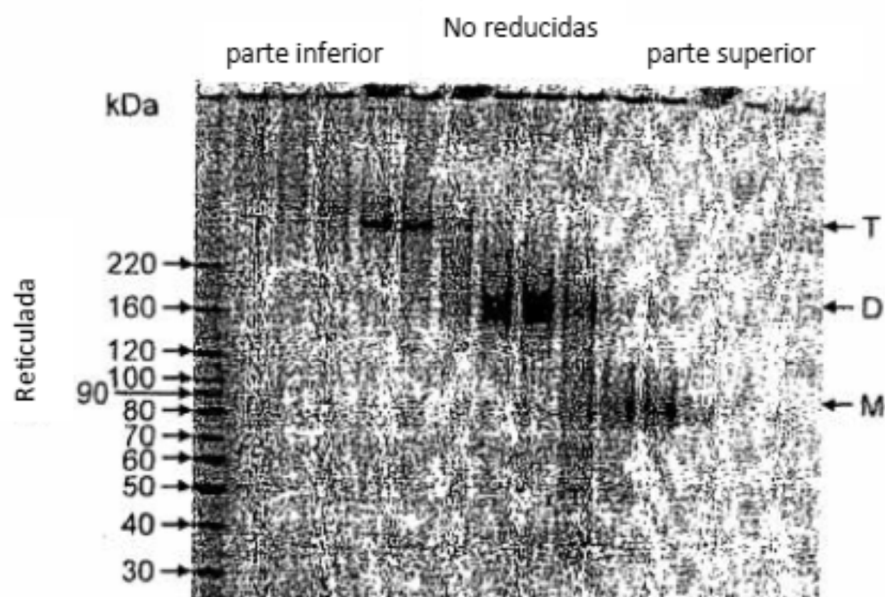


FIG.8B



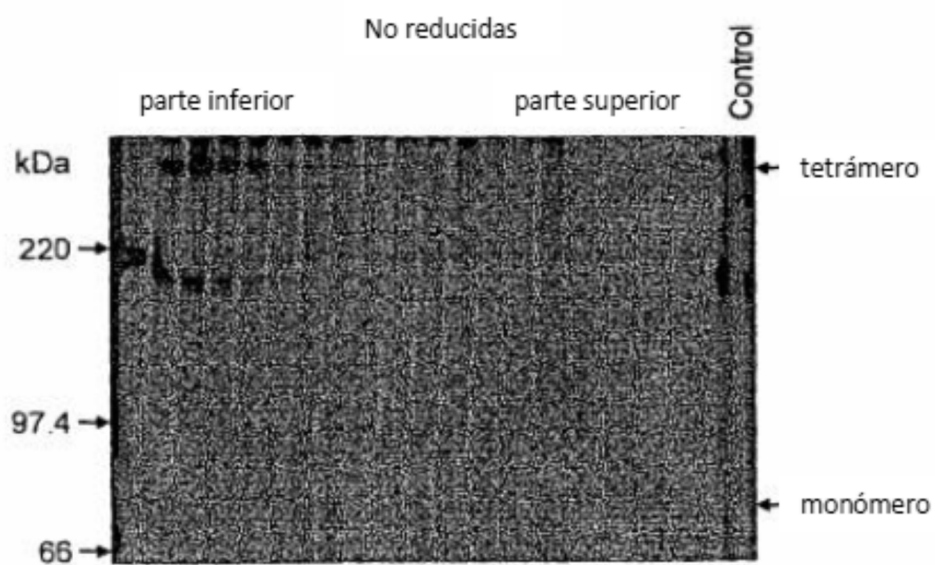


FIG. 9A

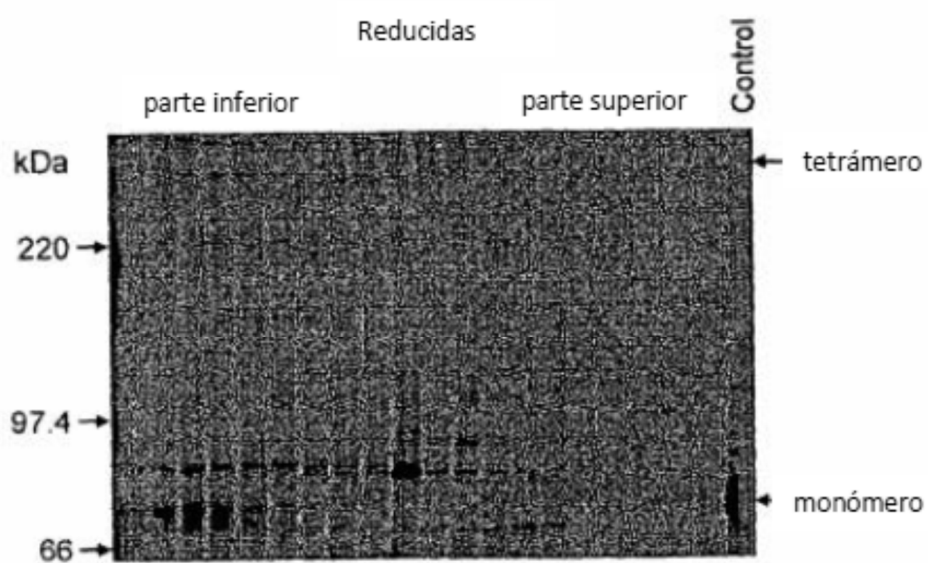


FIG. 9B

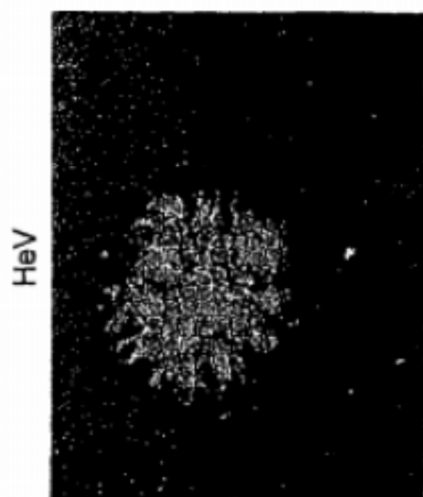


FIG. 10A

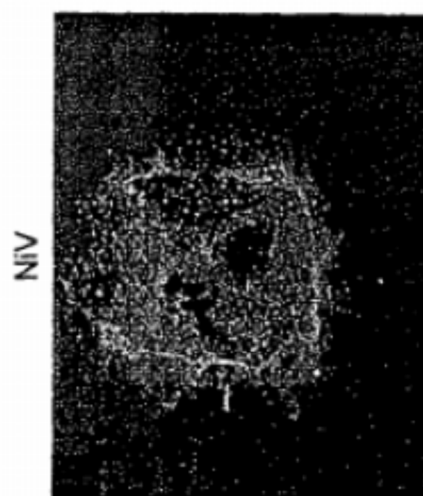


FIG. 10B

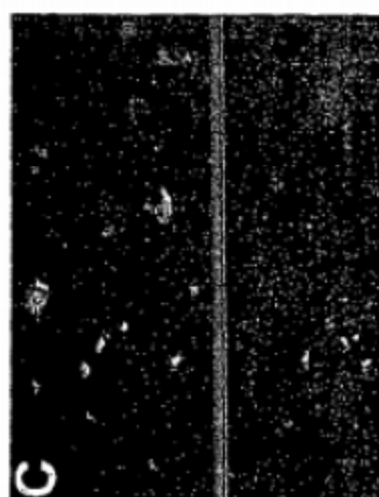


FIG. 10C

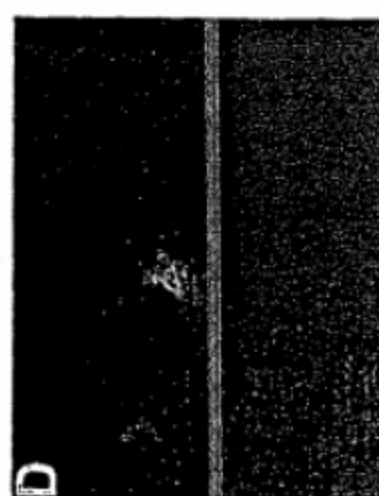


FIG. 10D

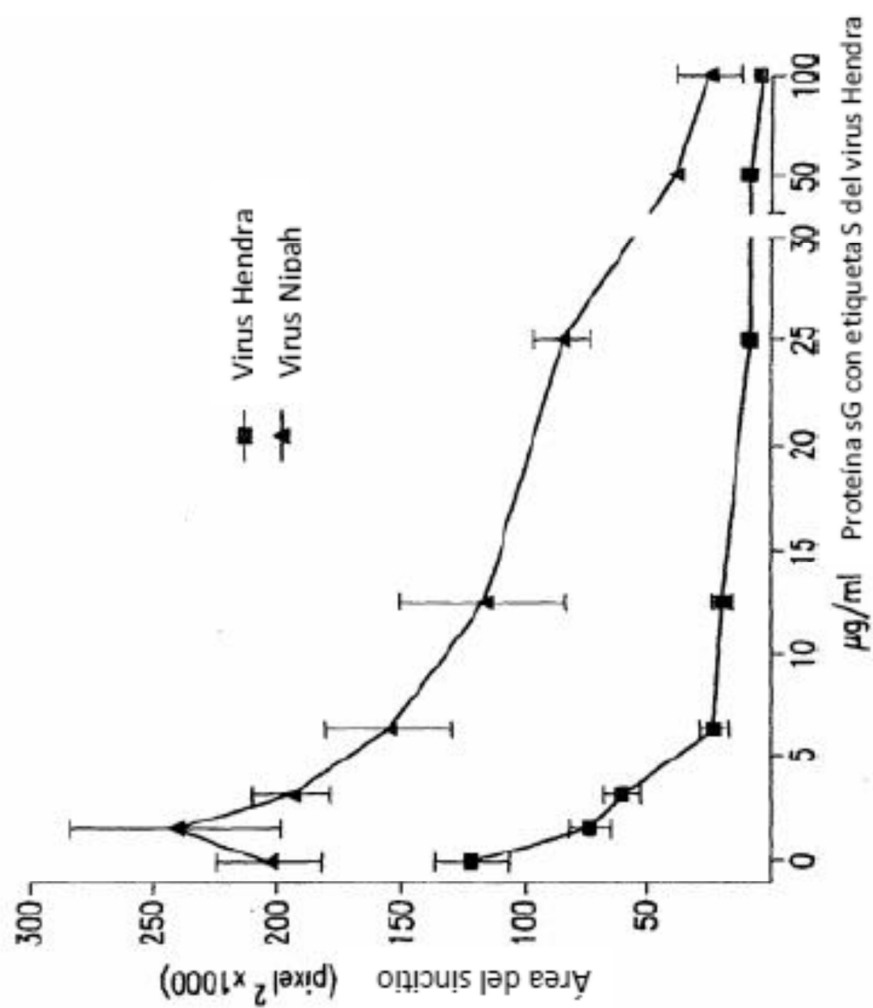


FIG.11

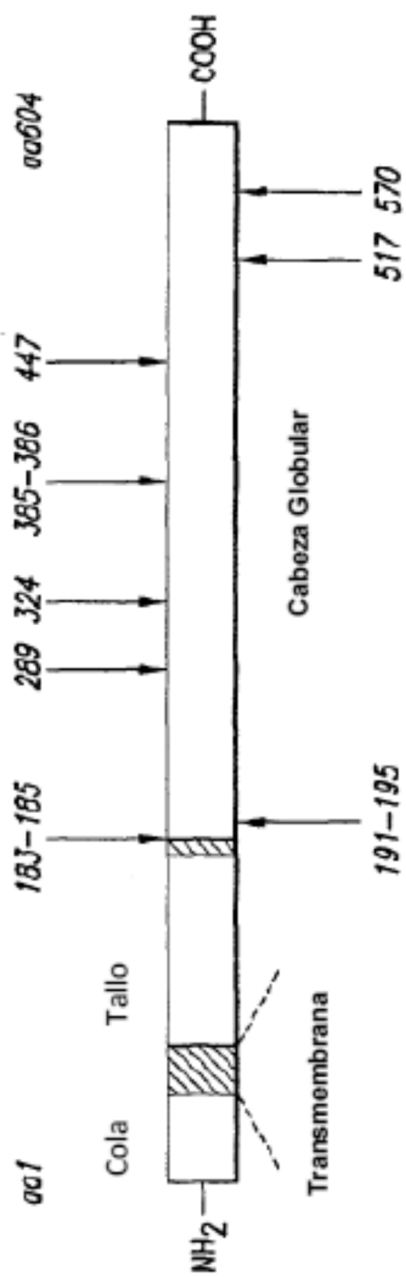
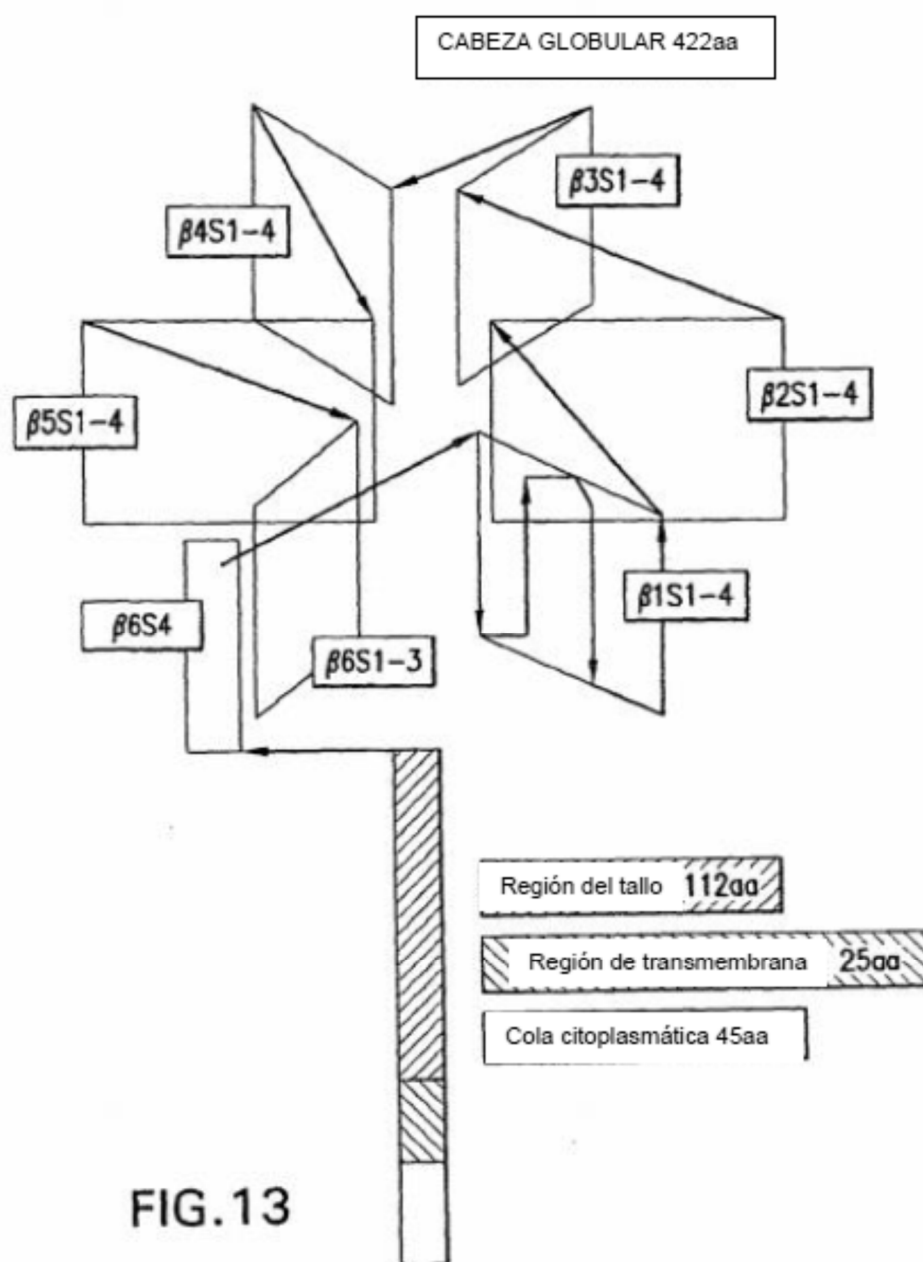


FIG. 12



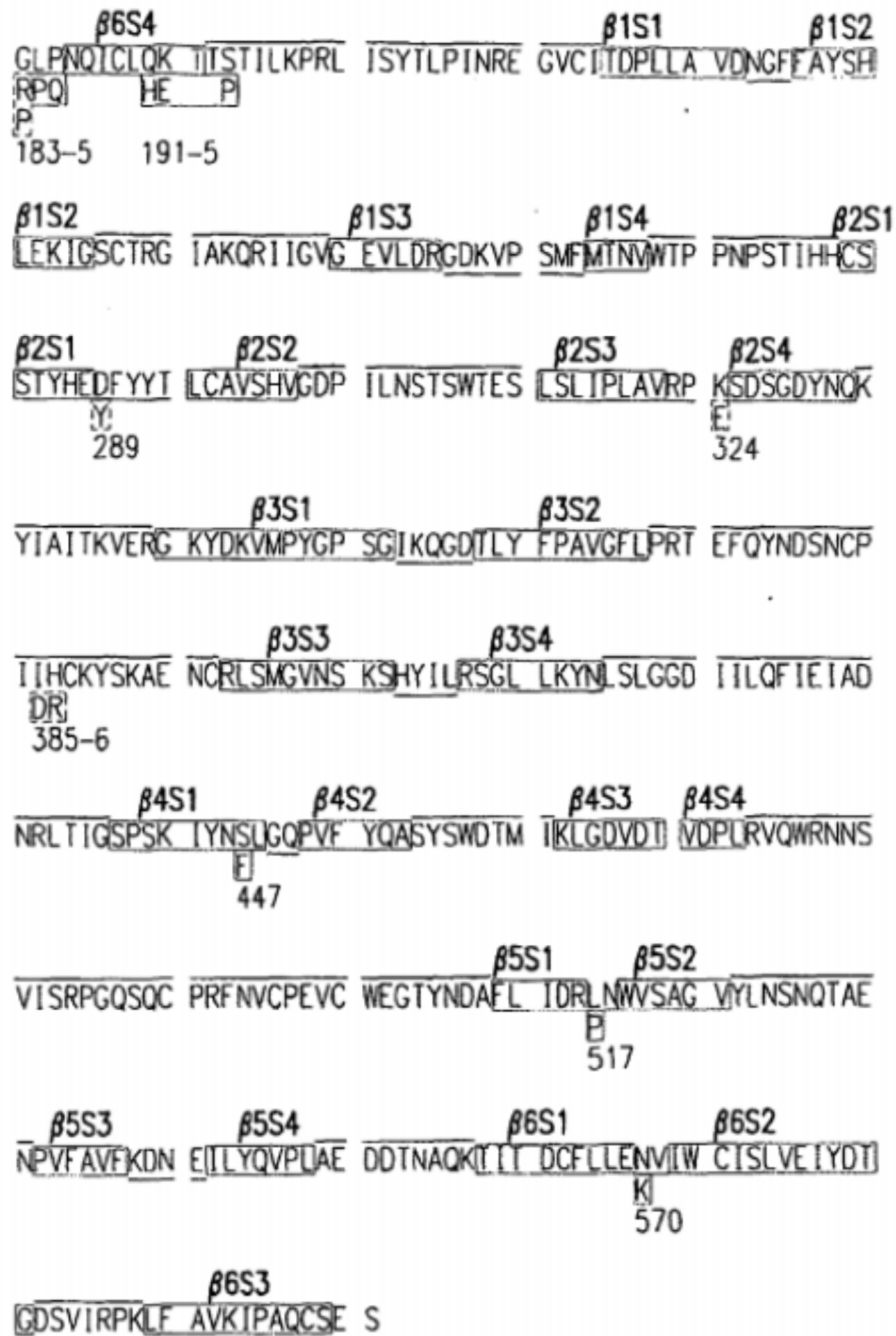


FIG.14