

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 392**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2011** **PCT/EP2011/070161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012** **WO12065997**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011** **E 11781825 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 2640419**

54 Título: **Vacuna contra el virus respiratorio sincicial**

30 Prioridad:

15.11.2010 GB 201019240

15.11.2010 US 458012 P

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

28.05.2019

73 Titular/es:

VIB VZW (50.0%)

Rijvisschestraat 120

9052 Gent, BE y

UNIVERSITEIT GENT (50.0%)

72 Inventor/es:

SAELENS, XAVIER;

SCHEPENS, BERT y

FIERS, WALTER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 714 392 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

Vacuna contra el virus respiratorio sincicial

- 5 La presente invención se refiere a una vacuna para su uso en un procedimiento de vacunación contra el virus respiratorio sincicial (VRS), como se define en la reivindicación 1 adjunta. Más específicamente, la invención se refiere a una vacuna de subunidad recombinante como se define en la reivindicación 1 adjunta, para su uso en un procedimiento de vacunación. El ectodominio de SH se denomina SHe. Preferentemente dicho ectodominio se presenta como un oligómero, incluso más preferentemente como un pentámero. La invención se refiere además a anticuerpos, específicos para dicho ectodominio, para su uso en la protección de un sujeto contra la infección por el VRS y/o en el tratamiento de un sujeto infectado.

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

- 15 La infección por el VRS es la causa principal de hospitalización de lactantes en los países industrializados.

Después de la infección primaria por el VRS, que, en general, se produce en menores de 2 años, la inmunidad al VRS permanece incompleta y se puede producir la reinfección. Además, el VRS puede causar una enfermedad grave en los ancianos y, en general, se asocia con mayor mortalidad que la gripe A en años no pandémicos (Falsey et al., 1995). La tasa de infección anual global estimada por la OMS en la población humana se estima en 64 millones de casos, con una cifra de mortalidad de 160 000; solo en EE. UU., de 85 000 a 144 000 lactantes son hospitalizados cada año como consecuencia de la infección por el VRS (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.html update 2009).

- 25 El VRS pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus*; en humanos, existen dos subgrupos, A y B. Aparte del VRS humano, existe una variante bovina. El genoma del VRS humano tiene aproximadamente 15 200 nucleótidos de longitud y es una molécula de ARN de sentido negativo. El genoma del VRS codifica 11 proteínas conocidas: glucoproteína (G), proteína de fusión (F), proteína hidrófoba pequeña (SH), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína grande (L), proteína de la matriz (M), proteína M2 ORF-1 (M2-1), proteína M2 ORF-2 (M2-2), proteína 1 no estructural (NS1) y proteína 2 no estructural (NS2). G, F y SH son proteínas de superficie transmembranarias; N, P, L, M, M2-1 son proteínas asociadas a la nucleocápside; y NS1 y NS2 son proteínas no estructurales. Se desconoce el estado de M2-2 como proteína estructural o no estructural. (Hacking y Hull, 2002). Los subgrupos del VRS muestran diferencias en las propiedades antigénicas de las proteínas G, F, N y P (Ogra, 2004). La infección por el VRS va seguida de la formación de anticuerpos específicos IgG e IgA detectables en el suero y algunos otros líquidos corporales. Varios estudios han demostrado que la producción de anticuerpos se dirige principalmente contra las principales proteínas transmembranarias F y G del VRS; solo los anticuerpos específicos contra F y G son conocidos por tener actividad neutralizante del VRS *in vitro*. La producción de anticuerpos contra la proteína F a menudo muestra reactividad cruzada entre los subgrupos A y B, mientras que la producción de anticuerpos contra la proteína G es específica de los subgrupos (Orga, 2004). Contrariamente a F y G, la proteína transmembranaria SH se considera no inmunógena (Giménez et al., 1987; Tsutsumi et al., 1989) y, en algunas vacunas experimentales, SH incluso se ha eliminado para obtener una vacuna atenuada no reversible (Karron et al., 2005).

- 45 Pringle C.R. et al., Vaccine, Elsevier Ltd, GB, vol. 11, n.º 4, páginas 473-478, divulgan una composición inmunógena que comprende un VRS con tres mutaciones sensibles a la temperatura.

Singh et al., Vaccine, Elsevier Ltd, GB, vol. 25, n.º 33, páginas 6211-6223, divulgan una composición inmunógena que comprende los residuos 412-524 de VRS-F.

- 50 Edward E. Walsh: "Respiratory Syncytial Virus Vaccine", Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2.ª edición, vol. 12, 2005, páginas 297-322, indica que se han identificado epítomos de linfocitos T y B en la proteína SH del VRS, pero no contiene ninguna referencia a su localización dentro de la secuencia de SH.

El desarrollo de vacunas para evitar la infección por el VRS se ha complicado por el hecho de que las respuestas inmunitarias del huésped parecen desempeñar un papel significativo en la patogenia de la enfermedad. Los primeros intentos de vacunación de niños con VRS inactivado con formol mostraron que los niños vacunados experimentaban una enfermedad más grave en la exposición posterior al virus en comparación con los controles no vacunados (Kapikian et al., 1969). Se han sometido a prueba vacunas vivas atenuadas, pero a menudo muestran una sobre o infraatenuación en los estudios clínicos (Murata, 2009).

60

Las vacunas de subunidades, que usan una proteína inmunógena o una combinación de proteínas inmunógenas, se consideran más seguras porque no pueden revertir o mutar a un virus virulento. Se han desarrollado vacunas experimentales basadas en la proteína F purificada y se han sometido a prueba en roedores, ratas algodóneras y humanos, y se demostró que son seguras, pero solo moderadamente inmunógenas (Falsey y Walsh, 1996; Falsey y Walsh, 1997; Groothuis et al. 1998). En un estilo similar, se han suspendido en la fase II ensayos clínicos con una mezcla de proteínas F, G y M (base de datos clínicos ADISinsight). Un enfoque alternativo consistió en una fusión genética recombinante del dominio antigénico de la proteína G del VRS humano en el extremo C-terminal del dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica (BBG2Na; Power et al., 2001). BBG2Na se investigó hasta un ensayo clínico de fase III en voluntarios sanos, pero el ensayo tuvo que interrumpirse debido a la aparición de efectos secundarios inesperados de hipersensibilidad de tipo 3 (púrpura) en algunos voluntarios inmunizados (Meyer et al., 2008).

Un desarrollo reciente es el uso de virus recombinantes quiméricos como vectores para antígenos del VRS. Se genomanipuló un parainfluenzavirus bovino/humano recombinante quimérico de tipo 3 (rB/HPIV-3) mediante la sustitución en un genoma de BPIV-3 de los genes F y HN por los genes homólogos de HPIV-3. La cepa de rB/HPIV-3 quimérica resultante se usó a continuación para expresar los genes F y G del HRSV (Schmidt et al., 2002). Esta vacuna está actualmente en investigación clínica.

Solo existe un número limitado de opciones de prevención y tratamiento disponibles para enfermedades graves causadas por el VRS. La intervención más ampliamente utilizada se basa en la inmunoprofilaxis pasiva con un anticuerpo monoclonal humanizado que se deriva del anticuerpo monoclonal de ratón 1129 (Beeler y van Wyke Coelingh, 1989). Este anticuerpo es específico contra la proteína F del VRS y neutraliza los virus de los subgrupos A y B. El anticuerpo humanizado recombinante 1129 es conocido como palivizumab (también conocido como Synagis) y se usa para el tratamiento profiláctico de lactantes que tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones tras la infección por el VRS. El anticuerpo se administra por vía intramuscular mensualmente para reducir el riesgo de infección por el VRS en los lactantes en riesgo debido a prematuridad, enfermedad pulmonar crónica o cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa (Bocchini et al., 2009). Algunos estudios han informado de proporciones de coste-efectividad aceptables para la profilaxis del VRS con palivizumab (Prescott et al., 2010).

Como no existe una vacuna aprobada en el mercado, todavía existe una necesidad no cubierta de desarrollo y disponibilidad de una vacuna segura y eficaz contra el VRS. Sorprendentemente, encontramos que la parte extracelular (ectodominio) de la pequeña proteína hidrófoba SH, conocida como SHe, se puede usar de manera segura para la vacunación contra la infección por el VRS, especialmente cuando se presenta en un vehículo como un oligómero, preferentemente como un pentámero. Además, también se pueden usar anticuerpos policlonales o monoclonales, dirigidos contra SHe, de forma profiláctica o terapéutica para la prevención o el tratamiento de la infección por el VRS, respectivamente.

Un primer aspecto de la invención es una vacuna como se define en la reivindicación 1 adjunta para su uso en un procedimiento de vacunación contra el VRS. En un modo de realización preferente, el VRS es un subgrupo A humano o una cepa del subgrupo B humano; en otro modo de realización preferente, el VRS es VRS bovino. La proteína SH es conocida por el experto en la técnica y contiene 64 (subgrupo A del VRS), 65 (subgrupo B del VRS) residuos de aminoácidos o 81, 77 o 72 residuos de aminoácidos para el VRS bovino. En un modo de realización preferente, el ectodominio de SH (SHe) consiste en los 23 aminoácidos carboxiterminales para el subgrupo A (SEQ ID N° 1) y en los 24 aminoácidos carboxiterminales para el subgrupo B (SEQ ID N° 2). Preferentemente, la secuencia del ectodominio se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID N° 1 (subgrupo A del ectodominio) y la SEQ ID N° 2 (subgrupo B del ectodominio). Una molécula vehículo es una molécula que es heteróloga para la proteína SH; un vehículo puede ser cualquier vehículo conocido por el experto en la técnica como adecuado para la presentación de un antígeno e incluye, pero no se limita a, partículas similivíricas, tal como HBcore (Whitacre et al., 2009), y otras VLP derivadas de proteínas de ensamblaje de la cápside o la cubierta del virus. También se puede utilizar cualquier otra construcción molecular, siempre que pueda presentar eficazmente antígenos al sistema inmunitario, tal como la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa pentamérica (comp.; McFarlane et al., 2009), las trombospondinas 3 y 4 (Malashkevich et al., 1996), la subunidad B de toxinas de tipo AB5 bacterianas (por ejemplo, la subunidad de la toxina del cólera o la toxina termolábil de *E. coli*; Williams et al., 2006), una cremallera de triptofano pentamérica (Liu et al., 2004), una cremallera de fenilalanina pentamérica (Liu et al., 2006) o una cremallera de leucinas derivada de GCN4 tetramérica (tGCN4, De Filette et al., 2008) y Lpp-56 (Shu et al., 2000). El vehículo puede ser de naturaleza proteínica, así como de naturaleza no proteínica. Los ejemplos de naturaleza no proteínica son, como ejemplo no limitativo, liposomas, construcciones CLIPS™ (Timmerman et al., 2007) y trimetilquitosano (Slütter et al., 2010).

Preferentemente, dicho vehículo presenta el SHe como un oligómero, incluso más preferentemente como un pentámero, presentando múltiples moléculas de SHe en un supercántigo, presentando un SHe en un supercántigo multimerizante, o mediante una combinación de ambos. El oligómero de SHe se puede presentar como una estructura lineal repetida, o como unidades de SHe individuales que forman un complejo oligomérico, o como una combinación de ambos. Preferentemente, dicho vehículo es un vehículo oligomérico (dímero, hasta decamérico). Incluso más preferentemente, dicho vehículo es un vehículo pentamérico. En un modo de realización específico, el dominio transmembranario de SH, preferentemente sin el dominio citoplásmico, se puede usar como dominio de oligomerización, fusionado o unido además a un vehículo. No todas las moléculas vehículo deben ser cargadas por el SHe; de hecho, como ejemplo no limitativo, se puede imaginar que solo 5 unidades de un vehículo hexamérico se cargan con SHe, presentando de este modo un complejo de SHe pentamérico en un complejo de vehículo hexamérico. El ectodominio se puede unir genéticamente al vehículo, formando una proteína de fusión; ambos dominios se pueden fusionar directamente, o se pueden unir por una secuencia bisagra o una secuencia espaciadora. Como se usa en el presente documento, en una construcción genéticamente fusionada, una secuencia bisagra es una secuencia de aminoácidos que une dos dominios entre sí; preferentemente, dicha secuencia une los dos dominios de una manera flexible; preferentemente, dicha secuencia bisagra es más corta que 150 aminoácidos, incluso más preferentemente más corta que 100 aminoácidos, incluso más preferentemente más corta que 50 aminoácidos, lo más preferentemente más corta que 20 aminoácidos. Un espaciador como se usa en el presente documento indica una secuencia bisagra corta más corta que 15 aminoácidos. En un modo de realización preferente, una secuencia bisagra comprende la secuencia (Gly-Ser)_n con n igual a uno, 2, 3, ...20. En otro modo de realización preferente, la bisagra de genes de inmunoglobulina, tal como la región bisagra de IgG1 humana, se usa como secuencia bisagra. En el caso de un enlace genético, dicho enlace se puede producir en el extremo aminoterminal de SHe, así como en el extremo carboxiterminal.

De forma alternativa, el ectodominio está químicamente unido al vehículo. El enlace químico es conocido por el experto en la técnica, e incluye, pero no se limita a, péptidos que están conjugados con el vehículo mediante la unión covalente de los péptidos a sitios reactivos en la superficie del vehículo. La estructura resultante es un conjugado. Un sitio reactivo en la superficie del vehículo es un sitio que es químicamente activo o que se puede activar y es accesible estéricamente para la unión covalente con un péptido. Un sitio reactivo preferente es el nitrógeno épsilon del aminoácido lisina. Unido covalentemente se refiere a la presencia de un enlace covalente que es estable a la hidrólisis en condiciones fisiológicas. Preferentemente, el enlace covalente es estable a otras reacciones que se pueden producir en condiciones fisiológicas, incluyendo la formación de aductos, la oxidación y la reducción. A menudo, el enlace de un péptido antigénico con un vehículo se logra usando reactivos bifuncionales (Hermanson, 1996). Cualquier residuo adecuado en el SHe se puede usar para enlace con el vehículo químico; preferentemente, SHe está unido al vehículo por su extremo aminoterminal o carboxiterminal. En todavía otro modo de realización, el ectodominio se une al vehículo por una interacción no covalente, tal como, pero no limitada a, interacciones hidrófobas, interacciones cooperativas de enlaces de H o interacciones de Van der Waals.

La vacuna se puede administrar al sujeto que se va a tratar por cualquier vía conocida por el experto en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, administración intranasal, intraperitoneal, intramuscular e intradérmica. Preferentemente, no existe una potenciación de los síntomas de la enfermedad en la infección por el VRS después de la vacunación. La vacuna puede ser para uso animal o humano. Un uso animal preferente es para la protección de ganado u otros bóvidos mediante la vacunación contra virus respiratorios bovinos relacionados con el VRS humano, tales como, pero no limitado a, VRS bovino. La protección contra la infección por el VRS cubre usos tanto profilácticos como terapéuticos. Más particularmente, un uso preferente de la vacuna es para propósitos profilácticos. La "preparación de una vacuna" como se usa en el presente documento significa que la composición inmunógena de la vacuna de acuerdo con la invención se puede optimizar mediante la adición de excipientes adecuados, o se puede formular para, como ejemplo no limitativo, aumentar el período de validez o mejorar las características farmacéuticas de la vacuna.

Como ejemplo no limitativo, se pueden mezclar composiciones inmunógenas que comprenden SHe del subgrupo A del VRS y SHe del subgrupo B del VRS para obtener una vacuna con una especificidad más amplia. Dicha vacuna puede ser para uso humano o veterinario. Aparte de la composición inmunógena, la vacuna comprende uno o más de otros compuestos, tal como un adyuvante. Preferentemente, la vacuna es una vacuna para la protección de seres humanos contra la infección por el VRS o, en animales, contra virus respiratorios de los animales relacionados con el VRS humano, tal como, pero no limitado a, VRS bovino.

La composición inmunógena de la vacuna de la invención se puede usar para la detección y/o purificación de anticuerpos, dirigida contra el ectodominio del VRS. Dichos anticuerpos se pueden aislar después de vacunar a un sujeto con la composición inmunógena de la invención; de forma alternativa, también se pueden obtener anticuerpos similares y/o células productoras de anticuerpos de un sujeto humano o animal infectado por el VRS y, después de un desarrollo apropiado conocido en la técnica, usar para la producción de anticuerpos específicos

contra SHe, preferentemente anticuerpos de tipo humano que se pueden usar para propósitos profilácticos o terapéuticos como se describe anteriormente.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo monoclonal que inhibe el VRS, dirigido contra el ectodominio de la proteína SH del VRS. La inhibición del VRS, como se usa en el presente documento, significa que, tras la infección, el título del virus pulmonar es menor en los animales tratados en comparación con los animales no tratados, según lo medido en un modelo animal adecuado. Preferentemente, dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.

Todavía otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ectodominio de la proteína SH del VRS, de acuerdo con la invención. De hecho, un órgano de un animal no humano inmunizado, preferentemente el bazo de dicho animal, o una muestra de sangre de un animal o un sujeto humano inmunizado, se puede usar como material de partida para la producción de anticuerpos monoclonales y derivados tales como, pero no limitado a, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos multivalentes o anticuerpos unidos a compuestos antivíricos. Dichos anticuerpos monoclonales y derivados se usan para inmunización pasiva o para el tratamiento de la infección por el VRS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: A, Las secuencias de aminoácidos del ectodominio de SH del VRS humano de subtipo A (VRSh) (SEQ ID N° 1), del ectodominio de SH del VRS humano del subtipo B (SEQ ID N° 2) y del ectodominio de SH del VRS bovino (VRSb) (SEQ ID N° 17). B, La secuencia de aminoácidos de Flag-COMPcc-SHe (SEQ ID N° 35). Los nueve primeros aminoácidos representan el epítipo Flag N-terminal. Los aminoácidos (AA) en letra cursiva representan el dominio de superhélice de COMP de rata (AA 25-72). El AA subrayado representa el ectodominio de la pequeña proteína hidrófoba del VRS A (SHe). C, Representación esquemática de la proteína pentamérica Flag-COMPcc-SHe. D, Representación esquemática de la proteína pentamérica COMPcc-SHe.

Figura 2: Purificación y determinación de la masa molecular relativa de Flag-COMPcc-SHe. A, Curvas de elución de aldolasa (1), conalbúmina (2), albúmina (3), quimotripsinógeno (4), ribonucleasa A (5) y Flag-COMPcc-SHe (6 en 7) por filtración en gel en una columna de Superdex 75. B, Tinción con azul de Coomassie de un análisis por SDS-PAGE de Flag-COMPcc-SHe después de la filtración en gel (pico 6 del panel A). C, Resumen de las proteínas usadas para calibrar la columna de filtración en gel, su peso molecular relativo (M_r), el volumen al que se eluyeron de la columna (V_e) y el K_{av} calculado ($K_{av} = (V_e - V_0)/(V_{tot} - V_0)$), con V_0 = el volumen vacío de la columna = 9,05 y V_{tot} = el volumen del lecho de la columna = 19,816). El M_r de Flag-COMPcc-SHe presente en el pico 6 se calculó en base a su V_e y la curva de calibración presentada en el panel D. D, La curva de calibración de la columna de filtración en gel de Superdex 75 usada para purificar Flag-COMPcc-SHe pentamérica.

Figura 3: La vacunación de ratones Balb/c con Flag-COMPcc-SHe en combinación con LTR192G induce anticuerpos específicos contra SHe. A, B y C, Determinación basada en ELISA de los títulos de anticuerpos IgG específicos contra péptidos de SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones después de la primera, segunda o tercera inmunización con las vacunas indicadas. D, Anticuerpos IgG, IgG1 y IgG2a específicos contra péptidos de SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones a los que se vacunó con PBS, M2e-1GCN4/LTR192G o Flag-COMPcc-SHe/LTR192G.

Figura 4: La vacunación con Flag-COMPcc-SHe, como en la leyenda de la figura 3, induce anticuerpos que pueden reconocer el ectodominio de SH en la superficie de las células. A, Análisis por citometría de flujo de células HEK293T que expresan GFP y SH del VRS teñidas con diferentes diluciones de suero de ratones vacunados con Flag-COMPcc-SHe. B, Análisis por citometría de flujo de células HEK que expresan GFP y SH del VRS teñidas con suero de ratones vacunados con Flag-COMPcc-SHe o M2e-tGCN4 (control negativo). C, Análisis por citometría de flujo de células HEK que expresan GFP y luciferasa teñidas con suero de ratones vacunados con Flag-COMPcc-SHe o M2e-tGCN4.

Figura 5: La vacunación con Flag-COMPcc-SHe inhibe la replicación del VRS. Cuatro días después de la exposición, los ratones de los grupos indicados se sacrificaron para determinar el título vírico en los pulmones mediante un análisis de calvas. El gráfico muestra el número de unidades formadoras de calvas por pulmón de cada ratón. El límite de detección del análisis de calvas es de 10 UFC por pulmón. La diferencia en el título de VRS en los pulmones entre los ratones vacunados con Flag-COMPcc-SHe y los ratones vacunados con M2e-tGCN4 fue altamente significativa (***) $p \leq 0,0005$.

Figura 6: La vacunación con Flag-COMPcc-SHe no induce una enfermedad potenciada tras la infección por el VRS. El gráfico muestra el peso corporal relativo de cada ratón, calculado como la proporción entre el peso en el

día del sacrificio (cuatro días después de la infección) y el peso en el día de la infección vírica, multiplicado por 100.

Figura 7: Enlace químico de péptidos SHe(cc4s) con los bucles inmunodominantes de partículas similivíricas de mHBc. Análisis por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de mHBc en las diferentes etapas del enlace químico como se indicó por encima del gel: mHBc = mHBc purificado, mHBc-SMBS + sMBS = mHBc después de la adición del conector químico Sulfo-MBS, mHBc-SMBS = mHBc-SMBS después la cromatografía de exclusión por tamaño, mHBc-SHe(cc4s) + SHe(cc4s) = mHBc-SMBS purificado después de incubación con el péptido de SHe(cc4s), mHBc-SHe(cc4s) = SHe unido a VLP de mHBc después de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Figura 8: mHBc-SHe(cc4s) conserva su conformación de VLP. El gráfico representa la distribución por tamaño de mHBc-SHe(cc4s) y la VLP 1604 de M2e-mBhc según lo determinado por dispersión dinámica de la luz. La distribución por tamaño se expresa en función del volumen.

Figura 9: Purificación de SHe-tGCN4. Análisis por SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie de SHe-tGCN4 después de la purificación mediante una serie de etapas cromatográficas de columna: intercambio aniónico, interacción hidrófoba y cromatografía de filtración en gel. Los paneles izquierdo y derecho representan el análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras (en presencia de beta-mercaptoetanol) o no reductoras (en ausencia de beta-mercaptoetanol), respectivamente. Las flechas indican proteínas SHe-tGCN4 monoméricas y dimericas.

Figura 10: La vacunación tanto con SHe-tGCN4 como con mHBc-SHe(cc4s) induce anticuerpos específicos contra péptidos de SHe. A, La figura representa los títulos de los anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones de los grupos indicados después de la primera inmunización, la primera inmunización de refuerzo (refuerzo) y la segunda inmunización de refuerzo (refuerzo 2), como se analizó por ELISA de péptidos de SHe. B, La figura representa los títulos de anticuerpos IgG, IgG1 y IgG2a específicos contra SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones de los grupos indicados después de la segunda inmunización de refuerzo, según lo determinado por ELISA de péptidos.

Figura 11: La vacunación tanto con SHe-tGCN4 como con mHBc-SHe(cc4s) disminuye la replicación pulmonar del VRS. Tres días después de la exposición, se sacrificaron los ratones para determinar el título vírico en los pulmones mediante QRT-PCR. El gráfico superior representa la expresión relativa del ARN genómico del VRS, normalizado a los niveles de ARNm de GAPDH presentes en las muestras de cada ratón en los grupos indicados. Se indican las diferencias estadísticas entre los grupos vacunados. El panel inferior (B) es idéntico al panel superior (A), pero también incluye los resultados de los ratones vacunados con PBS.

Figura 12: Ni la vacunación con mHBc-SHe (cc4s) ni con tGCN4-SHe inducen una enfermedad potenciada tras la infección por el VRS. La figura muestra el peso corporal relativo promedio de cada grupo de ratones indicado, calculado como la proporción entre el peso en el día indicado y el peso en el día de infección (día 0), multiplicado por 100.

Figura 13: 3D11 y 3G8 son dos Ac monoclonales específicos contra SHe de los subtipos IgG1 e IgG2a, respectivamente. El gráfico muestra la unión de series de dilución de 1 µg/µl de los anticuerpos monoclonales 3D11 y 3G8 con el péptido de SHe en un ensayo ELISA detectada por anticuerpos secundarios específicos IgG1 de ratón o IgG2a de ratón.

Figura 14: Los AcM 3D11 y 3G8 se unen al ectodominio de SH del VRS en células vivas que expresan la proteína SH del VRS en su superficie celular. A, Análisis por citometría de flujo de la unión de los AcM 3D11 y 3G8 y los respectivos anticuerpos de control emparejados por isotipo con células Hek293T que expresan GFP y la proteína SH del VRS. B, Análisis por citometría de flujo de la unión de los AcM 3D11 y 3G8 a células Hek293T que expresan GFP en combinación con la proteína SH del VRS o una proteína de control (luciferasa).

Figura 15: Unión de los AcM 3D11 y 3G8 a la superficie celular de células infectadas por el VRS. Se infectaron células Vero con 0,5 MOI de VRS A2. Veinte horas después de la transfección, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con 3D11 o 3G8 en combinación con un suero de anticuerpo policlonal anti-VRS para identificar las células infectadas y no infectadas. Los paneles superiores representan una visión general de la inmunotinción (tinción nuclear DAPI, 3D11 y suero policlonal de VRS), incluyendo células infectadas y no infectadas. Los paneles inferiores representan imágenes confocales de una célula infectada, indicada en el panel superior.

Figura 16: La inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales específicos contra SHe redujo la infección por el VRS en ratones. Se trataron ratones Balb/c con PBS, AcM 3G8 específico contra SHe o anticuerpos de control por isotipo por medio de administración intranasal un día antes y un día después de la exposición al VRS. Cada

símbolo representa el título de virus en los pulmones de ratones individuales, cuatro días después de la exposición al VRS. (** $p \leq 0,01$).

Figura 17: La vacunación intraperitoneal de ratones Balb/c con KLH-SHe en combinación con adyuvante incompleto de Freund induce anticuerpos específicos contra SHe y reduce la replicación del VRS. A, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en los sueros de ratones individuales después de la tercera inmunización (refuerzo 2) con las vacunas indicadas. B, Determinación basada en ELISA de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos contra SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones que se vacunaron con KLH-SHe. C, La vacunación con KLH-SHe no induce una enfermedad potenciada tras la infección por el VRS. El gráfico muestra el peso corporal relativo de cada ratón, calculado como la proporción entre el peso en el día del sacrificio (cinco días después de la infección) y el peso en el día de la infección vírica, multiplicado por 100. La diferencia en el peso corporal relativo entre los ratones vacunados con KLH-SHe y los ratones vacunados con KLH es significativa ($p \leq 0,005$, prueba de la U de Mann-Whitney). D, La vacunación con KLH-SHe altera la replicación del VRS. Cinco días después de la exposición con 10^6 UFC del VRS, se sacrificaron los ratones de los grupos indicados y se prepararon homogeneizados de pulmón para determinar el título vírico en los pulmones mediante un análisis de calvas. El gráfico muestra el número de unidades formadoras de calvas por pulmón de cada ratón. El límite de detección del análisis de calvas es de 20 UFC por pulmón. La diferencia en el título de VRS en los pulmones entre los ratones vacunados con KLH-SHe y los ratones vacunados con KLH es significativa ($p \leq 0,005$, prueba de la U de Mann-Whitney). E, Para ratones vacunados con KLH-SHe, unos títulos altos de anticuerpos séricos específicos contra SHe se correlacionan fuertemente con una reducción de la replicación del VRS. El gráfico muestra para cada ratón vacunado con KLH-SHe el título de anticuerpos IgG séricos específicos contra SHe y el número de UFC/pulmón que se podían detectar cinco días después de la infección. En el gráfico se muestran la curva de mejor ajuste (potencia) y su R^2 (coeficiente de determinación).

Figura 18: La vacunación intranasal de ratones Balb/c con KLH-SHe en combinación con LTR192G induce anticuerpos específicos contra SHe y reduce la replicación del VRS. A, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en los sueros de ratones individuales después de la tercera inmunización (refuerzo 2) con las vacunas indicadas. B, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos contra SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones que se vacunaron con KLH-SHe. C y D, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG e IgA específicos contra SHe presentes en el líquido del LBA de ratones individuales que se vacunaron con las vacunas indicadas y se infectaron por el VRS cinco días antes de la recogida de líquido del LBA. E, La vacunación con KLH-SHe altera la replicación del VRS. Cinco días después de la exposición con 10^6 UFC del VRS, se sacrificaron los ratones de los grupos indicados para determinar el título vírico en los pulmones mediante un análisis de calvas. El gráfico muestra el número de unidades formadoras de calvas por pulmón de cada ratón. El límite de detección del análisis de calvas es de 20 UFC por pulmón. La diferencia en el título de VRS en los pulmones entre los ratones vacunados con KLH-SHe y los ratones vacunados con KLH es significativa ($p \leq 0,05$, prueba de la U de Mann-Whitney). E, Para ratones vacunados con KLH-SHe, unos títulos altos de anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en el líquido del LBA se correlacionan fuertemente con una reducción de la replicación del VRS. Los gráficos muestran para cada ratón vacunado con KLH-SHe el título de anticuerpos IgG específicos contra SHe en el LBA y el número de UFC/pulmón que se podían detectar cinco días después de la infección. En el gráfico se muestran la curva de mejor ajuste y su R^2 (coeficiente de determinación).

Figura 19: La inmunización pasiva con antisuero de KLH-SHe reduce la infección por el VRS en ratones. A, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en los sueros de ratones individuales después de la tercera inmunización (refuerzo 2) con las vacunas indicadas. B, La inmunización pasiva con antisuero de KLH-SHe reduce la infección por el VRS en ratones. Se administró por vía intranasal suero de ratones vacunados con KLH-SHe o KLH, o PBS, a los ratones un día antes y un día después de la exposición al VRS. Cinco días después de la exposición con 10^6 UFC del VRS, se sacrificaron los ratones de los grupos indicados y se prepararon homogeneizados de pulmón para determinar el título vírico en los pulmones mediante un análisis de calvas. El gráfico muestra el número de unidades formadoras de calvas por pulmón de cada ratón. El límite de detección del análisis de calvas es de 20 UFC por pulmón. La diferencia en el título de VRS en los pulmones entre los ratones vacunados con KLH-SHe y los ratones vacunados con KLH es significativa ($p \leq 0,05$, prueba de la U de Mann-Whitney). C, La inmunización pasiva con suero de KLH-SHe no induce una enfermedad potenciada tras la infección por el VRS. El gráfico muestra la media $\pm$ EEM del peso corporal relativo de cada ratón, calculado como la proporción entre el peso en un día específico y el peso en el día de la primera inmunización pasiva, multiplicado por 100. La diferencia en el peso corporal relativo entre los ratones que se trataron con suero de KLH-SHe y los ratones que se trataron con suero de KLH es significativa ($p \leq 0,005$, prueba de la U de Mann-Whitney).

Figura 20: Enlace químico de péptidos de SHeB con los bucles inmunodominantes de partículas similivíricas de mHBc. Análisis por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de VLP de mHBc, VLP de mHBc unidas al reticulador heterobifuncional de SMBS (mHBc-SMBS) y las VLP de mHBc-SMBS purificadas con péptidos de SHeB unidos químicamente (mHBc-SHeB).

Figura 21: Unión de suero de ratones vacunados con mHBc-SHeB a la superficie de las células infectadas por el VRS B. Se infectaron células Vero con una cepa clínica del VRS B o se infectaron con inóculos inactivados. Setenta y dos horas después de la infección, las células se fijaron y bien se permeabilizaron o no se permeabilizaron. Las células infectadas y las infectadas con inóculos inactivados se tiñeron con suero de un ratón vacunado con mHBc-SHeB o con suero de ratones vacunados con KLH, como se indicó. La unión de los anticuerpos séricos contra mHBc-B o KLH a las células se analizó usando anticuerpos contra IgG de ratón unidos a Alexa488. A, Para el análisis microscópico, las células también se tiñeron con el tinte nuclear DAPI. B, Para el análisis citométrico de flujo, las células no permeabilizadas también se tiñeron con un suero de cabra anti-VRS para identificar las células infectadas por el VRS B. La unión de los anticuerpos séricos anti-VRS de cabra a las células se determinó usando anticuerpos contra IgG de cabra unidos a Alexa633. Los gráficos representan isogramas de intensidad de Alexa488/intensidad de Alexa633 de las células indicadas.

Figura 22: La vacunación con mHBc-SHeB induce anticuerpos específicos contra SHeB y reduce la inflamación pulmonar inducida por el VRS B. A, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG específicos contra SHeB y SHeA presentes en la mezcla de sueros de ratones después de la primera (i.m.), la segunda (refuerzo 1) y la tercera inmunización con mHBc-SHeB (refuerzo 2). B, Determinación basada en ELISA de los anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos contra SHe presentes en la mezcla de sueros de ratones que se vacunaron con KLH-SHe. C y D, Determinación basada en ELISA de anticuerpos IgG específicos contra SHeB (C) y SHeA (D) presentes en los sueros de ratones individuales que fueron vacunados con las vacunas indicadas. E, El número total de células presentes en los líquidos del LBA de ratones infectados por el VRS a los que se había vacunado con las vacunas indicadas. Existen significativamente menos células presentes en el líquido de LBA de ratones a los que se había vacunado con mHBc-SHe en comparación con el líquido de LBA de ratones a los que se había vacunado con mHBc. ($p \leq 0,05$, prueba de la U de Mann-Whitney). F, El número de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, monocitos, neutrófilos y eosinófilos presentes en los líquidos del LBA. Existen significativamente menos linfocitos CD8+ presentes en el líquido de LBA de ratones a los que se había vacunado con mHBc-SHe en comparación con el líquido de LBA de ratones a los que se había vacunado con mHBc. ($p \leq 0,05$, prueba de la U de Mann-Whitney).

Figura 23: Expresión y purificación de la proteína LPP₍₅₎-SHe. A, Expresión de la proteína LPP₍₅₎-SHe. Células de *E. coli* transformadas con pLH36-HisDEVD-LPP₍₅₎-SHe se estimularon con 1-tio-p-d-galactoprianósido (IPTG) 1 mM o no. Cuatro horas más tarde, se prepararon extractos en bruto por sonicación, seguido de centrifugación (13 000 × g, 30 min, 4 °C). El sobrenadante se analizó mediante SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia usando el anticuerpo monoclonal 3G8 específico contra SHe. B, Análisis de la proteína LPP₍₅₎-SHe purificada. Después de la purificación, se analizó la proteína LPP₍₅₎-SHe mediante SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie (izquierda) e inmunoelectrotransferencia (derecha) usando el anticuerpo monoclonal 3G8 específico contra SHe.

Figura 24: calendario de vacunación de las ratas algodóneras. Los números de grupo se refieren a:

Grupo 1: 6 ratas algodóneras (RA) sin vacuna y expuestas a VRS el día +63 (control de infección)

Grupo 2: 6 RA inoculadas por vía intranasal con VRS-Tracy a $2,04 \times 10^5$ UFC/RA el día 0

Grupo 3: 6 RA cada una, vacunadas por vía intraperitoneal (i.p.) con KLH-SHe + IFA

Grupo 4: 6 RA cada una, vacunadas por vía intraperitoneal (i.p.) con KLH + IFA (control con vehículo)

Grupo 5: 6 RA cada una, vacunadas por vía intramuscular (i.m.) con 1:10 de Bennett de VRS inactivado con formol (IF) cultivado en células Vero (control positivo para exacerbación inmunitaria tras la exposición)

EJEMPLOS

Materiales y procedimientos para los ejemplos

Clonación y construcción de plásmidos.

Construcción del plásmido de expresión pLT32 Flag-COMPcc-SHe. Se ordenó un plásmido, que contenía la secuencia codificante de Flag-COMPcc-SHe (Figura 1.B) en Genscript (SEQ ID N° 31). La secuencia codificante de Flag-COMPcc-SHe se ligó como un fragmento NdeI/NotI en un vector de expresión bacteriana pLT32H abierto con NdeI/NotI (Mertens et al., 1995)

Construcción del vector de expresión pCAGGS-Etag-SH. Se preparó ARN total de células Hep-2 infectadas por el VRS A2 usando el kit de tejido de ARN de alta pureza (Roche, Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la síntesis del ADNc, la secuencia codificante de SH del VRS A2 se amplificó utilizando los siguientes cebadores directos e inversos (5'ATAAGAAAGCGGCCGCTATGGAAAATACATCCATAACAATAG3'; 5 AAGATCTCTATGTGTTGACTCGAGCTCTTGGTAACTCAA3'). El producto de PCR se digirió con NotI y BglII y se ligó en un vector de expresión pCAGGS-PTB-Etag abierto con NotI/BglII (Cornells et al., 2005). El vector resultante pLT32-Flag-COMPcc-SHe fue depositado según el tratado de Budapest en BCCM (BCCM/LMBP: Technologiepark 927, 9052 Zwijnaarde, Bélgica) con el número de depósito LMBP 6817 el 8 de noviembre de 2010.

La construcción del vector de expresión pCAGGS-Luc se describió anteriormente (Schepens et al., 2005; denominado pCAGGS-HIF-RLuc)

Construcción del vector de expresión pLT32 de mHBc. La secuencia codificante de mHBc, como se describe anteriormente por Jegerlhener et. al. como parte del plásmido "ab1", se ordenó en Geneart (SEQ ID N° 32) (De Filette et al., 2005; Jegerlehner et al., 2002). Esta secuencia codificante se clonó como un fragmento NdeI/NotI en un vector de expresión bacteriana pLT32H abierto con NdeI/NotI.

Construcción del vector de expresión pLT32 SHe-tGCN4-Flag. Para construir pLT32 SHe-tGCN4, la secuencia codificante de SHe se fusionó con la secuencia codificante de tGCN4-Flag por fusión per. El fragmento SHe para fusión per se amplificó usando los cebadores: 5 GAATTCATATGAACAAGTTATGTGAGTACAACG3' y 5 ATTTGTTTAAACCTCCTGTATTTACTCGTGCCCGAGGCAA3' y un plásmido de molde que se ordenó a Geneart (SEQ ID N° 33) y que contenía la secuencia codificante del ectodominio de SH del VRS A2 (NKLCEYNVFHNKTFELPRARVNT) (SEQ ID N° 40). El fragmento GCN4 para PCR de fusión se amplificó utilizando los cebadores 5 CCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGATTGAGA3' y 5TATTAACCCTCACTAAAGGGAAGG3' y un plásmido de molde que contenía la secuencia codificante tGCN4, fusionada en el extremo C-terminal a la secuencia codificante de 3 secuencias sucesivas del epítipo Flag (SEQ ID N° 34; De Filette et al., 2008). Los dos fragmentos de PCR se fusionaron usando los cebadores: 5'GGAATTCATATGAACAAGTTATGTGAGTACAACG3' y 5' TATTA ACC CTC ACTA A AG G G A AG G 3'. Este producto de PCR de fusión se clonó como un fragmento NdeI/HindIII en un vector de expresión bacteriana pLT32H abierto con NdeI/HindIII. El pLT32 SHe-tGCN4-Flag resultante se depositó según el tratado de Budapest en BCCM (BCCM/LMBP: Technologiepark 927, 9052 Zwijnaarde, Bélgica) con el número de depósito LMBP 6818 el 8 de noviembre de 2010.

La construcción del vector de expresión PLT32 M2e-tGCN4 se describió anteriormente (De Filette et al., 2008).

Construcción del plásmido de expresión pLH36-HisDEVD-LPP(5)-SHe. Se ordenó en Genscript un plásmido que contenía la secuencia codificante de la cremallera de triptófano LPP(5) fusionada con la secuencia codificante del ectodominio SH separada por la secuencia codificante de un conector GlyGly. Esta secuencia codificante se amplificó usando los cebadores directos e inversos siguientes (5 'GCGAAATGGGATCAGTGGAGCAGC-3'; 5'AATATAGGATCCCTAGGTCGCCAGTTATCCCAGCG-3'), fosforilados y digeridos con BamHI. El pLH36-HisDEVD-LPP-SHe se construyó mediante un ligado de tres puntos usando el fragmento de PCR descrito, el fragmento de plásmido pLT32 digerido con BamHVPstI y el fragmento pLH36 digerido con EcoRV/PstI. La secuencia del plásmido pLH36-HisDEVD-LPP(5)-SHe construido se muestra en SEQ ID N° 49.

Expresión y purificación de SHe-tGCN4, M2e-tGCN4, Flag-COMPcc-SHe, mHBc y LPP₍₅₎-SHe.

Se cultivó un precultivo de 30 ml de *E. coli* transformada con pLT32SHe-tGCN4 a 28 °C en caldo de Luria y se usó para inocular 1 litro de medio fresco. A una A600 de 0,6-0,8, las células se trataron con 1 mm de isopropil-1-tiogalactopiranosido, se incubaron durante otras 4 horas y, a continuación, se recogieron mediante centrifugación (6000 <x> g, 20 min, 4 °C). El sedimento bacteriano se resuspendió en 20 ml de tampón Tris-HCl (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM y EDTA 1 mM), pH 8, y se sonicó. Los residuos bacterianos se sedimentaron por centrifugación (20 000 <x> g, 1 h, 4 °C). El sobrenadante se aplicó a una columna de DEAE Sepharose previamente equilibrada con tampón Tris-HCl que contenía NaCl 50 mM (tampón A). Después de lavar, las proteínas unidas se eluyeron mediante un gradiente en dos etapas que iba desde un 0-40 % de tampón B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M) y un 40-100 % de tampón B. Se combinaron fracciones que contenían SHe-tGCN4, se ajustaron a una saturación de un

25 % de sulfato de amonio, y se aplicaron a una columna de fenil-Sepharose previamente equilibrada con sulfato de amonio al 25 %, Tris-HCl 50 mM, pH 8. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente en dos etapas. La elución en dos etapas se realizó con un 0-40 y 40-100 % de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8 (tampón A). Las fracciones que contenían SHe-tGCN4 se cargaron en una columna Superdex 75. Se realizó filtración en gel en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las fracciones que contenían SHe-tGCN4 se combinaron y conservaron a -70 °C.

La expresión y purificación de flag-COMPcc-SHe fue idéntica a SHe-tGCN4 aparte del uso de una columna de Q-Sepharose para cromatografía de intercambio aniónico en lugar de una columna de DEAE Sepharose.

La expresión y purificación de M2e-tGCN4 se describió antes (De Filette et al., 2008). La expresión y purificación de mHBc fue idéntica a SHe-tGCN4 aparte del uso de una columna Sephacryl S400 para cromatografía de filtración en gel en lugar de una columna Superdex 75.

Expresión y purificación de LPP₍₅₎-SHe. Se cultivó un precultivo de 30 ml de células de *E. coli* transformadas con pLH36-HisDEVD-LPP₍₅₎-SHe a 28 °C en caldo de Luria con ampicilina y se usó para inocular 3 litros de medio fresco. A una A₆₀₀ de 0,6-0,8, las células se trataron con isopropil-1-tio-β-d-galactopiranosido 1 mM, se incubaron durante otras 4 horas y, a continuación, se recogieron mediante centrifugación (6000 × g, 20 min, 4 °C). El sedimento bacteriano se resuspendió en 300 ml de tampón que contenía NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 300 mM e imidazol 5 mM, pH 7,5 y se sonicó. Los residuos bacterianos se sedimentaron por centrifugación (20 000 × g, 1 h, 4 °C). El sobrenadante se cargó en una columna de níquel-Sepharose previamente equilibrada con tampón que contenía imidazol 5 mM. Después de lavar, las proteínas unidas se eluyeron mediante un gradiente de imidazol en etapas (50 mM, 100 mM, 200 mM y 400 mM). Se combinaron fracciones que contenían LPP₍₅₎-SHe, se desalaron y se purificaron además en una columna de Q-Sepharose. La muestra se aplicó a una columna de DEAE Sepharose previamente equilibrada con tampón Tris-HCl que contenía NaCl 50 mM (tampón A). Después de lavar, las proteínas unidas se eluyeron mediante un gradiente en dos etapas que iba desde un 0-40 % de tampón B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M) y un 40-100 % de tampón. Las fracciones que contenían LPP₍₅₎-SHe se cargaron en una columna Superdex 75. Se realizó filtración en gel en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las fracciones que contenían LPP₍₅₎-SHe

Adyuvantes

Se usó un mutante bionactivado de enterotoxina de *E. coli* termolábil, LTR192G, para administración intranasal (i.n.); esta preparación fue generosamente proporcionada por el Dr. J. Clements (Departamento de Microbiología e Inmunología, Tulane University Medical Center, Nueva Orleans, LA, EE. UU.) (Norton et al., 2010).

Enlace químico y caracterización de partículas de SHe-HBc.

Se ordenó SHe(cc4s), un péptido de SHe purificado por HPLC sintetizado químicamente en el que la cisteína natural se reemplazó por una serina y al que se le añadió una cisteína en el extremo N, a Pepscan (Pepscan, Lelystad). El péptido SHe(cc4s) se fusionó por medio de su residuo de cisteína N-terminal a una lisina en el bucle inmunodominante de mHBc en la superficie de las VLP de HBc mediante un enlace químico usando el sulfo-MBS heterobifuncional (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, 400 µg de mHBc, disueltos en 200 µl de PBS, se incubaron con Sulfo-MBS (a una concentración final de 1 mg/ml) durante una hora. Después de la retirada de moléculas de Sulfo-MBS no unidas mediante cromatografía de exclusión por tamaño, las VLP de mHBc unidas a sulfo-MBS se diluyeron en 2 ml de H₂O. Posteriormente, se le añadió 100 µl de péptido SHe(cc4s) (disuelto en 100 ml de PBS) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente para permitir la reticulación del péptido con las VLP de mHBc. Finalmente, se retiró el péptido SHe(cc4s) libre mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La pureza y eficacia de la reticulación se sometió a prueba por medio de SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie.

Células

Se cultivaron células Hep-2 (ATCC, CCL-23), células Vero (ATCC, CCL-81), células HEK293T (un regalo del Dr. M. Hall) y células A549 ATCC, CCL-185) en medio DMEM complementado con suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor al 10 %, penicilina al 1 %, estreptomycin al 1 %, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Carlsbad, California) y piruvato de sodio 1 mM.

Ratones y virus.

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra libres de patógenos específicos de Charles River (Charles River Wiga, Sulzfeld, Alemania). Los animales se alojaron en un ambiente de temperatura controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12 h; se administraron alimentos y agua a voluntad. Se inmunizaron los ratones a las 8 semanas de edad después de adaptación durante 1 semana en la sala de los animales.

La instalación para animales desarrolla su actividad con el número de licencia del gobierno flamenco LA1400091. Todos los experimentos se realizaron en las condiciones especificadas por la ley (Directiva Europea y Real Decreto belga de 14 de noviembre de 1993) y fueron autorizados por el Comité de Ética Institucional sobre animales de experimentación.

Se propagó el VRS A2, un subtipo A del RSV, (ATCC, Rockville) infectando monocapas de células Vero, con 0,1 MOI en presencia de medio de crecimiento que contenía FCS al 1 %. De cinco a siete días después de la infección, las células y el medio de crecimiento se recogieron, se combinaron y se clarificaron por centrifugación (450 × g). Para concentrar el virus, el sobrenadante clarificado se incubó durante 4 horas a 4 °C en presencia de polietilenglicol al 10 % (PEG6000). Después de la centrifugación (30 minutos a 3000 × g), el sedimento se resuspendió en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), que contenía sacarosa al 20 %, se dividió en partes alícuotas y se conservó a -80 °C.

Inmunizaciones e infecciones intranasales.

Para la inmunización o infección intranasal, se anestesió ligeramente a los ratones con isoflurano. El volumen final usado para la administración de vacuna + adyuvante o virus fue de 50 µl (25 µl por fosa nasal).

Se formularon vacunas + adyuvante en PBS, mientras que el inóculo vírico se formuló en HBSS.

Determinación del título vírico en los pulmones mediante análisis de calvas.

Tres o cuatro días después de la exposición, los ratones fueron sacrificados. Los pulmones de los ratones se extrajeron asépticamente y se homogeneizaron con un homogeneizador Heidolph RZR 2020 durante 30 segundos en 1 ml de HBSS que contenía un 10 % de sacarosa. Los homogeneizados de pulmón se aclararon posteriormente mediante centrifugación a 4 °C y se usaron para la titulación del virus en células Hep-2. Se infectaron monocapas de células Hep-2 con 50 µl de diluciones 1:3 sucesivas de los homogeneizados de pulmón en una placa de 96 pocillos en medio OPTIMEM sin suero (Invitrogen) complementado con penicilina y estreptomycin. Cuatro horas más tarde, las células se lavaron dos veces con medio DEMEM que contenía FCS al 2 % y se incubaron durante 5 días a 37 °C en 50 µl de medio de recubrimiento (medio DEMEM completo que contenía FCS al 1 %, agarosa al 0,5 %). Las células se fijaron añadiendo 50 µl de una solución de paraformaldehído al 4 % en la parte superior del recubrimiento de agarosa. Después de fijación durante la noche a 4 °C, se retiraron el medio de recubrimiento y la solución de paraformaldehído, las células se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % (PBS/BSA). Posteriormente, se añadió suero policlonal de cabra anti-VRS (AB1128, Chemicon International) (1/4000). Después de lavar tres veces con PBS/BSA, las células se incubaron con anticuerpos contra IgG de cabra conjugados con HRP (SC2020, Santa Cruz) durante 30 minutos. Los anticuerpos no fijadores se retiraron lavando cuatro veces con PBS/BSA que contenía Triton-X100 al 0,01 % y una vez con PBS. Finalmente, las calvas se visualizaron mediante el uso de sustrato de peroxidasa TrueBlue (KPL, Gaithersburg). Se contaron las calvas de diferentes diluciones y para cada dilución se calculó el número de UFC por pulmón (1 ml) como: número de calvas presentes en la dilución × la dilución × 20 (= 1000 µl de volumen de sobrenadante total/50 µl del volumen de sobrenadante usado para infectar el primer pocillo de la serie de dilución). El número de UFC/pulmón se calculó como el número promedio de UFC/pulmón calculado para las diferentes diluciones. Como cada sobrenadante de los pulmones homogeneizados se sometió a prueba por duplicado, el número final de UFC/pulmón se calculó como el promedio de estos duplicados.

Determinación del título vírico en los pulmones por qRT-PCR.

Para determinar la carga del VRS en los pulmones mediante qRT-PCR, se prepararon homogeneizados de pulmón y se clarificaron como se describe anteriormente. Se preparó ARN total de estos homogeneizados de pulmón mediante el uso del kit de tejido de ARN de alta pureza (Roche, Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó ADNc mediante el uso de cebadores hexaméricos y el kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche, Mannheim). Los niveles relativos de ADNc genómico de M de VRS se determinaron mediante el uso de qRT-PCR usando cebadores específicos para el ARN genómico del gen M del VRS A2 (5TCACGAAGGCTCCACATACA3' y 5 CAGGGTCATCGTCTTTTTC3') y una sonda de nucleótidos (n.º 150 Universal Probe Library, Roche) marcada con fluoresceína (FAM) en el extremo 5' y con un tinte oscuro extintor de fluorescencia cerca del extremo 3'. La cantidad relativa de ARNm de GADPH se

determinó mediante qRT-PCR usando cebadores específicos para GADPH de ratón (5TGAAGCAGGCATCTGAGGG3' y 5 GAAGGTGGAAGAGTGGGAG3' y LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche). La cantidad relativa de ARN genómico del VRS por homogeneizado de pulmón se calculó como la proporción entre la cantidad relativa de ARN del gen M del VRS y la cantidad relativa de ARNm de GADPH de ratón.

ELISA de péptidos

Dos semanas después de cada inmunización, se recogieron muestras de sangre de la vena lateral de la cola. La sangría final se realizó mediante punción cardíaca de animales anestesiados con avertina. La sangre se dejó coagular durante 30 minutos a 37 °C y se obtuvo suero tomando el sobrenadante de dos centrifugaciones posteriores.

Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos mediante ELISA usando mezclas de sueros del grupo. Para determinar los títulos de anticuerpos específicos contra M2e o SHe, se recubrieron placas de microtitulación (F96 MaxiSorp tipo II, Nunc) con 50 µl de una solución de 2 µg/ml de péptido de M2e o solución de 2 µg/ml de péptido de SHe en tampón de bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9.7, respectivamente, y se incubaron durante la noche a 37 °C. Después de lavar, las placas se bloquearon durante 1 h con 200 µl de BSA al 1 % en PBS. Después de 1 hora de incubación, las placas se lavaron de nuevo. Una serie de diluciones 1/3 de las diferentes muestras de suero, comenzando con una dilución 1/100, se cargaron en las placas recubiertas con péptido. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo marcado con peroxidasa dirigido contra los isotipos IgG1 o IgG2a de ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, EE. UU.) y se diluyeron 1/6000 en PBS + BSA al 1 % + Tween 20 al 0,05 %. Después de lavar, las placas de microtitulación se incubaron durante 5 minutos con sustrato TMB (tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H3PO4 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Los títulos de punto final se definen como la dilución más alta que produce un valor de DO dos veces mayor que el del fondo (suero previo a la inmunización).

Análisis citométrico de flujo.

Se transfectaron células Hek293T con los vectores de expresión indicados. Veinticuatro horas después, las células se separaron usando un tampón de disociación libre de enzimas (Invitrogen, Carlsbad, California), se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante una hora en PBS que contenía BSA al 1 % (PBS/BSA). Posteriormente, las células se incubaron con el suero o anticuerpos indicados en las concentraciones indicadas. Una hora después, las células se lavaron 3 veces con PBS/BSA y se incubaron con los anticuerpos secundarios contra IgG de ratón Alexa 633 durante 30 minutos. Después de lavar las células cuatro veces con PBS/BSA y una vez con PBS, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson LSR II. Se seleccionaron células individuales que expresaban GFP en base a la superficie del pico de la señal de dispersión lateral, la superficie del pico y la altura del pico de la señal de dispersión frontal y la superficie del pico de la señal de fluorescencia verde. Finalmente, de estas células individuales GFP positivas, se midió la señal de fluorescencia de alexa 633.

Inmunotinción

Se infectaron células Vero con inóculos inactivados o con 0,5 MOI de VRS A2 en presencia de medio sin suero. Cuatro horas después, el virus libre se lavó y las células se incubaron en medio de crecimiento que contenía FCS al 1 %. Dieciséis horas después, las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 20 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con detergente Triton-X100 al 0,2 % durante 5 minutos. Después de lavar una vez con PBS, las células se bloquearon en PBS/BSA. Una hora después, se le añadió anticuerpo monoclonal 3G8 específico contra SHe o anticuerpo de control por isotipo a una concentración final de 5 µg/ml. Después de lavar las células dos veces con PBS/BSA se le añadió suero de cabra anti-VRS policlonal. Una hora más tarde, las células se lavaron tres veces con PBS/BSA. La unión de los anticuerpos indicados a las células se analizó mediante el uso de anticuerpos contra IgG de ratón y de cabra marcados con los tintes fluorescentes alexa 488 y alexa 568, respectivamente. Se registraron imágenes confocales de las células teñidas con un microscopio confocal Zeiss.

Generación de hibridomas que producen AcM contra SHe

Se generaron células de hibridoma estables que producían anticuerpos monoclonales específicos contra SHe (AcM) mediante tecnología de hibridoma (Kohler y Milstein 1975). Brevemente, se derivaron hibridomas específicos de SHe de ratones individuales que se inmunizaron i.p. tres veces a intervalos de tres semanas con 10 µg de la vacuna SHe-tGCN4 con Alhydrogel como adyuvante (Brenntag Biosector). Tres días antes de la fusión, se

administró refuerzo a los ratones un tiempo adicional con la misma formulación y se aislaron esplenocitos que, a continuación, se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 en presencia de PEG 1500 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Las células fusionadas se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 10 %, BM condimed HI al 10 % (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), L-glutamina 2 mM, y beta-mercaptoetanol 24 µM y suplemento 1x HAT (Invitrogen, Carlsbad, California). Se identificaron híbridos que secretaban anticuerpos específicos contra SHe mediante cribado con ELISA de péptidos de SHe y se obtuvieron anticuerpos monoclonales que producían híbridos después de dos rondas de subclonación mediante un procedimiento de dilución limitante. Los anticuerpos monoclonales se purificaron en una columna de proteína A-Sepharose (ingeniería eléctrica, biociencias).

Los hibridomas resultantes se depositaron según el tratado de Budapest en BCCM (BCCM/LMBP: Technologiepark 927, 9052 Zwijnaarde, Bélgica) con los números de depósito LMBP 7795CB para 3G8 el 8 de noviembre de 2010 y LMBP 7796CB para 3D11 el 10 de noviembre de 2010, respectivamente.

Ejemplo 1: Diseño, expresión y purificación de Flag-COMPcc-SHe

La proteína SH se expresa en la superficie de viriones del VRS y la membrana plasmática de células infectadas por el VRS como un pentámero. La organización pentamérica de SH está organizada por el dominio transmembranario de SH, que se oligomeriza como una superhélice de 5 hélices alfa paralelas. Para presentar el ectodominio de SH C-terminal (SHe) del VRS A como un pentámero que imita su conformación natural, SHe se fusionó genéticamente con el dominio corto de la superhélice pentamérica de la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa de rata (COMPcc) que también está compuesta por 5 hélices alfa paralelas (Malashkevich et al., 1996; Figura 1). Se fusionó un epítipo Flag con el extremo N de COMP, dando Flag-COMPcc-SHe. Flag-COMPcc-SHe se clonó en un vector de expresión pLT-32 (Mertens et al., 1995), se expresó en *E. coli* y se purificó. El análisis por filtración en gel reveló que Flag-COMPcc-SHe se eluyó como un complejo de 55-60 kDa, lo que indica que las proteínas Flag-COMPcc-SHe de 11 kDa sí se oligomerizan, de hecho, en pentámeros (Figura 2).

Ejemplo 2: La vacunación con Flag-COMPcc-SHe induce anticuerpos específicos contra SHe y protección contra infecciones por el VRS

Para someter a prueba si la vacunación con Flag-COMPcc-SHe podía evocar protección contra la infección por el VRS, usamos un modelo de infección por el VRS en ratón BALB/c. Se inmunizaron ratones BALB/c tres veces por vía intranasal con 25 µg de Flag-COMPcc-SHe en combinación con 1 µg de adyuvante LTR192G de enterotoxina termolábil de *E. coli*. Como controles negativos se usaron PBS y el ectodominio M2 de Influenza A fusionado a un supercóntigo de GNC4 tetramérico (M2e-tGNC4) (De Filette et al., 2008). Las inmunizaciones se realizaron cada quince días. Se usó una única infección por el VRS (5×10^5 UFC) como control positivo. Entre la primera y la segunda semana después de cada inmunización, se recogió sangre para investigar la inducción de anticuerpos IgG específicos contra SHe. La presencia de anticuerpos específicos contra SHe se sometió a prueba por primera vez mediante ELISA de péptidos de SHe. Se usó ELISA de péptido de M2e como control negativo. La figura 3 demuestra que los anticuerpos IgG específicos contra el péptido de SHe se inducen y refuerzan, respectivamente, después de la segunda y tercera inmunización con Flag-COMPcc-SHe. Tres inmunizaciones de Flag-COMPcc-SHe/LTR192G sucesivas dieron como resultado niveles altos de anticuerpos IgG2a específicos contra SHe, pero solo niveles bajos de anticuerpos IgG1 específicos contra SHe, lo que indica una respuesta inmunitaria orientada/impulsada por Th1. No se pudieron detectar anticuerpos IgG específicos contra SHe en ratones vacunados con PBS o M2e-tGNC4/LTR192G (Figura 3A, B y C). Como se esperaba, no se pudieron detectar anticuerpos específicos contra M2e en los sueros de los datos de ratones vacunados con Flag-COMPcc-SHe/LTR192G o PBS. Los ratones que fueron inmunizados con M2e-tGNC4 acumularon un título alto de anticuerpos IgG2a específicos contra M2e, de acuerdo con los resultados anteriores (De Filette et al., 2008).

A continuación, investigamos si anticuerpos específicos contra SHe presentes en el antisero de Flag-COMPcc-SHe podían unirse a células que expresaban la proteína SH del VRS en su superficie mediante citometría de flujo. Se transfectaron células HEK-293T con un vector de expresión GFP, en combinación con un vector de expresión de SH (pCAGGS-Etag-SH) o un vector de expresión de luciferasa (pCAGGS-Luc) como control negativo. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se separaron, se tiñeron con diferentes diluciones de antisero de Flag-COMPcc-SHe o M2e-tGNC4 y se analizaron mediante citometría de flujo. La figura 4 ilustra que, a diferencia del antisero de M2e-tGNC4, el suero de ratones vacunados con Flag-COMPcc-SHe se une específicamente a la proteína SH expresada en la superficie de las células vivas.

Para someter a prueba si la vacuna Flag-COMPcc-SHe/LTR192G puede provocar protección contra la infección por el VRS, los ratones fueron expuestos a 1×10^6 UFC de VRS A2, nueve semanas después de la última inmunización. Cuatro días después de la infección, se sacrificaron los ratones para determinar el título vírico en los

pulmones mediante análisis de calvas. La figura 5 ilustra que, en comparación con los ratones vacunados con PBS y M2e-tGCN4, la vacunación con Flag-COMPcc-SHe redujo la replicación del VRS. No se detectó ningún virus en el ratón que fue infectado por VRS vivo antes de la exposición.

Es bien conocido que la vacunación con virus inactivado con formol o proteína G del VRS puede inducir la potenciación de la enfermedad tras la infección, lo que da como resultado una morbilidad significativa, por la inducción de una respuesta inmunitaria de Th2 desequilibrada (Prince et al., 1986). Para someter a prueba si también la vacunación con Flag-COMPcc-SHe podría inducir una potenciación de la enfermedad, monitorizamos el peso corporal antes y después de la exposición al VRS (Figura 6). No se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos de ratones después de la exposición al VRS. Esto sugiere firmemente que la vacunación con Flag-COMPcc-SHe no da como resultado una potenciación de la enfermedad tras la infección por el VRS.

Ejemplo 3: Diseño, construcción y purificación de mHBc-SHe

La partícula similivírica (VLP) de proteína del núcleo del virus de la hepatitis B (HBc) puede presentar antígenos como una matriz densa. De este modo, mHBc-VLP pueden inducir una fuerte respuesta inmunitaria humoral hacia el antígeno presentado (Boisgerault et al., 2002). Por lo tanto, como alternativa a la presentación de SHe como un pentámero, se presentó el ectodominio de SH en el bucle de la región inmunodominante de mHBc-VLP. Se obtuvieron HBc-SHe-VLP mediante enlace químico de péptidos de SHe con mHBc, un mutante de HBc en el que se introdujo una lisina en la parte superior de la región inmunodominante de HBc (De Filette et al., 2005). Para permitir el enlace químico, se le añadió un residuo de cisteína al extremo N de SHe. Además, el residuo de cisteína, presente en la posición 4 del péptido de SHe, se reemplazó por un residuo de serina. Este péptido se llamaba SHe-CC4S. Después de la purificación de las mHBc-SHe-VLP, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se examinó el grado de reticulación mediante SDS PAGE. La figura 7 ilustra que aproximadamente un 50 % de las proteínas HBc está unido químicamente a un péptido SHe-CC4S. Las bandas de migración más lenta probablemente representan monómeros mHBc a los que se unieron 2 o 3 péptidos SHe(cc4s). Para someter a prueba si las proteínas mHBc unidas a SHeCC4S todavía se ensamblan en VLP del tamaño esperado (30-34 nm), se realizaron análisis de dispersión dinámica de la luz en las partículas de mHBc-SHe generadas y la VLP 1604 M2e-HBc como referencia completamente funcional. La figura 8 ilustra que la distribución por tamaño de mHBc-SHe-CC4S se superpone con la del control 1604 M2e-HBc, con un máximo a 30 nm, que se corresponde con el tamaño informado de las VLP de HBc (Clarke et al., 1987).

Ejemplo 4: Diseño, construcción y depuración de SHe-tGCN4-Flag

Además de presentar el péptido de SHe en la superficie de las VLP de mHBc, SHe se fusionó también con tGCN4, que es conocido que induce una fuerte respuesta humoral hacia péptidos fusionados (Ref marina GCN4). SHe y un epítipo Flag se unieron genéticamente a los extremos 5' y 3', respectivamente, de la secuencia codificante de tGCN4 y se clonaron en un vector de expresión PLT32. Después de la expresión en *E. coli*, se purificó SHe-tGCN4-Flag recombinante mediante cromatografía de intercambio aniónico, de interacción hidrofóbica y de filtración en gel (Figura 9).

Ejemplo 5: La vacunación con mHBc-SHe(CC4S) y SHe-tGCN4 induce anticuerpos específicos contra SHe y protección frente a infecciones por el VRS

Para someter a prueba si la vacunación con mHBc-SHe(CC4S) y SHe-tGCN4 puede evocar protección frente a infecciones por el VRS, se vacunaron ratones Balb/c tres veces por vía intranasal con 10 µg de mHBc-SHe(CC4S) y SHe-tGCN4 en combinación con 1 µg de adyuvante LTR192G. Se usaron PBS y mHBc vacío, este último en combinación con 1 µg de LTR192G, como controles negativos. Las inmunizaciones se realizaron cada 3 semanas. Una sola infección por el VRS ($5 \cdot 10^5$ UFC) se usó como control positivo. Entre la segunda y la tercera semana después de cada inmunización, se recogió sangre para investigar la inducción de anticuerpos IgG específicos contra SHe. La presencia de anticuerpos específicos contra SHe se sometió a prueba mediante ELISA de péptidos de SHe. La figura 10A demuestra que los anticuerpos IgG específicos contra el péptido de SHe se inducen y refuerzan, respectivamente, después de la segunda y tercera inmunización con mHBc-SHe(CC4S) y SHe-tGCN4. Tres inmunizaciones de Flag-COMPcc-SHe/LTR192G sucesivas dieron como resultado niveles altos de anticuerpos IgG2a específicos contra SHe y niveles algo más bajos de anticuerpos IgG1 específicos contra SHe, lo que indica una respuesta inmunitaria orientada/impulsada por Th1 (Figura 10 B).

Para someter a prueba si la vacunación con mHBc-SHe(CC4S) o SHe-tGCN4 puede obstaculizar la infección por el VRS, se expuso a los ratones a $5 \cdot 10^6$ UFC de VRS-A2 3 semanas después de la última inmunización de refuerzo. Tres días después de la exposición, se sacrificaron los ratones para determinar los niveles de VRS-A2 en los pulmones mediante «PCR». La figura 11 muestra que todos los ratones que fueron vacunados con mHBc-

SHe(CC4S) o SHe-tGCN4 o los ratones que se infectaron previamente por el VRS tienen niveles pulmonares más bajos de ARN genómico del VRS que los ratones que fueron vacunados con mHBc. Estos datos confirman nuestra observación anterior de que la vacunación basada en SHe mucosa puede proteger parcialmente a los ratones frente a la replicación del VRS. Sorprendentemente, todos los ratones que fueron vacunados con un mHBc vacío en combinación con el adyuvante LTR192G mostraron niveles más bajos de VRS que los ratones que fueron inmunizados con PBS sin adyuvante LTR192G. Esto podría explicarse por el efecto de LTR192G en el sistema inmunitario innato del ratón. Se ha demostrado que la enterotoxina termolábil de *E. coli* proporciona protección genérica frente a las infecciones víricas pulmonares, incluyendo el VRS por medio de la impronta innata (ref. Williams y Husel 2004). El efecto de la impronta innata por LTR192G en la replicación vírica pulmonar parece ser pasajero, ya que el impacto de TLR192R en la replicación del VRS se reduce fuertemente cuando la infección vírica se produce nueve semanas después de la última administración de LTR192G. Nuevamente, ninguno de los ratones mostró una pérdida significativa de peso corporal, lo que indica que la vacunación con SHe cuando se presenta mediante VLP o tGCN4 no está induciendo potenciación de la enfermedad tras la exposición (Figura 12).

Ejemplo 6: Producción y sometimiento a prueba de anticuerpos monoclonales específicos contra SHe.

Para investigar si anticuerpos específicos contra SHe que pueden interactuar con células infectadas pueden proporcionar protección contra infecciones por el VRS, desarrollamos anticuerpos monoclonales específicos contra SHe basados en ratones inmunizados con SHe-TGCN4. Para la producción de anticuerpos, se seleccionaron, subclonaron y usaron un hibridoma de subtipo IgG1 (3D11) y uno de IgG2a (3G8) que producían anticuerpos que se unían eficazmente al péptido de SHe en un ELISA. Los 3D11 y 3G8 se purificaron por medio de cromatografía de afinidad con proteína A y se sometieron a prueba para determinar la eficacia de unión a SHe por medio de un ELISA. La figura 13 muestra que 3D11 y 3G8 se pueden unir al péptido de SHe recubierto y son, respectivamente, del subtipo IgG1 e IgG2a.

Como los anticuerpos pueden proteger contra infecciones víricas mediante el reconocimiento y la destrucción de células infectadas por (ADCC) o CDC, investigamos si los AcM 3D11 y 3G8 específicos contra SHe pueden reconocer SH en la superficie de las células. Por lo tanto, se transfectaron células Hek293T con un vector de expresión de SH del VRS o con un vector de luciferasa Firefly de control (Schepens et al., 2005), ambos en combinación con un vector de expresión de GFP. Veinticuatro horas después de la transfección, se tiñeron células vivas con diferentes concentraciones de los anticuerpos monoclonales específicos contra SHe (3D11 y 3G8) o los anticuerpos específicos contra M2e de la gripe emparejados por isotipo (IgG1 14C2 y un AcM IG2a específico contra M2e). Se usó suero policlonal de ratones inmunizados con Flag-COMPcc-SHe como control positivo. La figura 14 demuestra que el suero policlonal con Flag-COMPcc-SHe, pero también los AcM 3D11 y 3G8 se pueden unir fácilmente a células que expresan SH pero no a células de control. Por el contrario, ninguno de los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos contra M2e de la gripe se podían unir a células que expresan SH. Estos datos demuestran claramente que tanto 3D11 como 3G8 pueden reconocer el ectodominio de SH expresado en la superficie de las células.

Durante la infección, la proteína SH del VRS se expresa principalmente en el RE, el aparato de Golgi y la membrana celular. Por eso, para investigar más directamente si los anticuerpos específicos contra SH del VRS pueden reconocer células infectadas por medio de SH, expresada en la superficie de estas células, realizamos inmunotinción de células infectadas por el VRS e infectadas con inóculos inactivados. Se infectaron células epiteliales pulmonares A594 humanas con 0,05 MOI de VRS o se infectaron con inóculos inactivados. Veinticuatro horas después de la infección, las células se fijaron y se tiñeron con los AcM 3D11 o 3G8 específicos contra SHe en combinación con antisuero policlonal anti-VRS.

La figura 15 ilustra que los AcM específicos contra SHe 3D11 y 3G8 pueden reconocer fácilmente la SH en la membrana celular y cerca del núcleo (probablemente correspondiente al RE y el aparato Golgi) de las células infectadas. Esto indica que los AcM contra SHe protegen contra la infección por el VRS al reconocer las células infectadas por el VRS. De esta manera, los AcM contra SHe 3D11 y 3G8 descritos en el presente documento se pueden usar como tratamiento profiláctico o terapéutico.

Ejemplo 7: La inmunización pasiva usando el AcM 3G8 específico contra SHe reduce la replicación del VRS.

Para someter a prueba si anticuerpos específicos contra SHe pueden reducir la replicación del VRS *in vivo*, se inmunizaron ratones pasivamente con anticuerpos monoclonales específicos contra SHe. Se administraron por vía intranasal anticuerpos monoclonales 3G8 específicos contra SHe, anticuerpos de control por isotipo o PBS a ratones un día antes y un día después de la exposición al VRS. Tres días después de la exposición al VRS, se

recogió sangre para someter a prueba la presencia de AcM en el suero de los ratones tratados. Cuatro días después de la exposición al VRS, los ratones se sacrificaron para determinar el título vírico en los pulmones. Un ELISA de péptidos demostró la presencia de concentraciones bajas de anticuerpos específicos contra SHe y de control por isotipo en el suero de ratones tratados con los anticuerpos respectivos (datos no mostrados). La figura 16 ilustra que los ratones que recibieron anticuerpos monoclonales específicos contra SHe tienen títulos reducidos de VRS en los pulmones en comparación con los ratones que se trataron con PBS o anticuerpos monoclonales de control por isotipo. Estos datos sugieren que la administración intranasal de anticuerpos específicos contra SHe puede reducir la infección por el VRS en ratones.

Ejemplo 8: construcción de SHe-KLH

Para someter a prueba si las vacunas basadas en SHe también pueden proteger contra infecciones por el VRS cuando esta vacuna se administra por medio de una ruta alternativa con un adyuvante alternativo y con un vehículo diferente, la vacuna se sometió a prueba por vía intraperitoneal, con hemocianina de lapa californiana (KLH) como vehículo. Se unió químicamente KLH activada con maleimida (Pierce) al péptido (CGGGSNKLSEYNVFHNKTFELPRARVNT (SEQ ID N° 50); la secuencia correspondiente al ectodominio de SH (SHe) del VRS A está subrayada) correspondiente al ectodominio de SH del VRS A. Para promover el enlace químico direccional, se le añadió un conector CysGlyGlyGlySer al extremo N del péptido de SHe del VRS A. Además, el residuo de cisteína presente en la SHe del VRS A natural se sustituyó por un residuo de serina. El enlace químico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce). Las proteínas KLH-SHe reticuladas se aislaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 9: La vacunación intraperitoneal con KLH-SHe reduce la replicación del VRS en ratones.

Para someter a prueba si la vacunación intraperitoneal (i.p.) con una vacuna basada en SHe puede evocar protección contra infecciones por el VRS, se vacunaron ratones Balb/c (seis ratones por grupo) tres veces por vía intraperitoneal con 20 µg de KLH-SHe o KLH, cada uno en combinación con 50 µl de adyuvante incompleto de Freund (Milipore). Se usó vacunación con PBS sin adyuvante como un control negativo adicional. Entre la segunda y tercera semana después de la vacunación, se recogió sangre para determinar la inducción de anticuerpos IgG específicos contra SHe. La presencia de anticuerpos específicos contra SHe se determinó y cuantificó mediante el ELISA del péptido de SHe. La figura 17 (AB) demuestra que 3 vacunaciones sucesivas con KLH-SHe inducen niveles altos de anticuerpos IgG específicos contra SHe tanto del subtipo IgG1 como del IgG2a. No se pudieron detectar anticuerpos IgG específicos contra SHe en sueros de ratones vacunados con PBS o KLH. Además, el análisis citométrico de flujo reveló que el suero derivado de ratones que se habían vacunado por vía intraperitoneal con KLH-SHe se puede unir específicamente a células HEK293T que expresan la proteína SH del VRS en su superficie, mientras que el suero previo a la inmunización no lo hacía.

Para someter a prueba si la vacunación intraperitoneal con KLH-SHe puede reducir la infección por el VRS, los ratones vacunados se infectaron con 1.10^6 UFC de VRS-A2, 4 semanas después de la última vacunación. Cinco días después de la exposición, se sacrificaron los ratones para determinar el título de VRS-A2 en los pulmones mediante análisis de calvas. La figura 17D ilustra que se pudo detectar significativamente menos virus en los pulmones de los ratones vacunados con SHe-KLH que en los pulmones de los vacunados con KLH ($p > 0.005$, prueba de la *U* de Mann-Whitney). La observación de que, entre los ratones vacunados con KLH-SHe, los títulos más altos de anticuerpos séricos IgG específicos contra SHe se correlacionaron fuertemente ($R^2 = 0.95$) con niveles más bajos de VRS en los pulmones el día 5 posterior a la infección sugiere que la reducción de la replicación del VRS por la vacunación con KLH está mediada por anticuerpos específicos contra SHe (Figura 17E). El peso corporal de todos los ratones se monitorizó el día de la infección y el día del sacrificio. La figura 17C ilustra que los ratones que fueron vacunados con KLH-SHe ganaron significativamente más peso que los ratones que fueron vacunados con KLH ($p > 0.005$, prueba de la *U* de Mann-Whitney). Estos datos demuestran que la vacunación intraperitoneal con una vacuna basada en SHe puede reducir la replicación del VRS sin inducir morbilidad. Además, estos datos ilustran que junto con mHBc, tGCN4 y COMPcc, también se puede usar KLH como vehículo de proteínas para vacunas basadas en péptido de SHe. Además, estos datos ilustran que, junto con Titermax, también se puede usar adyuvante incompleto de Freund como adyuvante apropiado para inducir inmunidad específica contra SH.

Ejemplo 10: La vacunación intranasal con KLH-SHe reduce la replicación del VRS en ratones.

Para someter a prueba si la vacunación intranasal con KLH-SHe puede evocar protección contra infecciones por el VRS, se vacunaron ratones Balb/c (seis ratones por grupo) tres veces por vía intranasal con 20 µg de KLH-SHe o KLH, cada uno en combinación con 1 µg de adyuvante LTR192G. Se usó vacunación con PBS sin adyuvante

como un control negativo adicional. Entre la segunda y tercera semana después de la vacunación, se recogió sangre para investigar la inducción de anticuerpos IgG específicos contra SHe.

La presencia de anticuerpos específicos contra SHe se sometió a prueba mediante ELISA de péptidos de SHe. La figura 18 (AB) demuestra que 3 vacunaciones sucesivas con KLH-SHe inducen anticuerpos IgG específicos contra SHe tanto del subtipo IgG1 como del IgG2a. No se pudieron detectar anticuerpos IgG específicos contra SHe en sueros de ratones vacunados con PBS o KLH. Además, el análisis citométrico de flujo reveló que el suero derivado de ratones que se vacunaron por vía intranasal con suero de KLH-SHe, pero no suero previo a la inmunización, se puede unir específicamente a células HEK293T que expresan la proteína SH del VRS en su superficie.

Para someter a prueba si la vacunación intraperitoneal con KLH-SHe puede reducir la infección por el VRS, los ratones vacunados se infectaron con 1.10^6 UFC de VRS-A2, 9 semanas después de la última vacunación. Cinco días después de la exposición, se sacrificaron los ratones para recoger líquido de LBA (lavado broncoalveolar) (3 ml). El título de VRS-A2 en los líquidos de LBA recogidos se determinó mediante análisis de calvas. La figura 18E ilustra que se pudo detectar significativamente menos virus en los pulmones de los ratones vacunados con KLH-SHe que en los pulmones de los vacunados con KLH ($p > 0,05$, prueba de la *U* de Mann-Whitney). La presencia de anticuerpos IgA e IgG específicos contra SHe en los líquidos de LBA recogidos se analizó mediante ELISA de péptido de SHe. Este análisis reveló que, por el contrario que en los ratones vacunados con PBS y KLH, los líquidos de LBA de los ratones vacunados con KLH-SHe contenían anticuerpos específicos contra SHe tanto IgG como IgA (Figura 18C-D). Los niveles de anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en el líquido de LBA de ratones vacunados con KLH-SHe se correlacionaron con los niveles de anticuerpos IgG específicos contra SHe en el suero de los ratones respectivos. La observación de que, entre los ratones vacunados con KLH-SHe, títulos más altos de anticuerpos IgG específicos contra SHe presentes en el líquido de LBA se correlacionan fuertemente ($R^2 = 0,97$) con títulos más bajos de VRS en los pulmones el día 5 posterior a la infección sugiere que la reducción de la replicación del VRS por la vacunación con KLH está mediada por anticuerpos específicos contra SHe (Figura 18 F). Estos datos demuestran que la vacunación intranasal con una vacuna basada en SHe puede reducir la replicación del VRS sin inducir morbilidad. Además, estos datos confirman que, junto con mHBc, tGCN4 y COM Pec, también se puede usar KLH como vehículo de proteínas para vacunas basadas en péptido de SHe.

Ejemplo 11: La transferencia pasiva de antisuero de KLH-SHe protege contra la infección por el VRS en ratones.

Para investigar más a fondo si la reducción de la replicación del VRS, en ratones que han sido vacunados con una vacuna basada en SHe, puede estar mediada por anticuerpos específicos contra SHe del VRS, se realizaron experimentos de transferencia pasiva. Se vacunaron por vía intraperitoneal ratones Balb/c con 20 μ g de KLH-SHe o KLH, ambos en combinación con 75 μ l de adyuvante incompleto de Freund. Como control negativo adicional, se vacunaron ratones con PBS sin adyuvante. El ELISA de péptido de SHe ilustró que los sueros de todos los ratones que se habían vacunado con KLH-SHe contienen altos niveles de anticuerpos IgG específicos contra SHe. Después de la sangría final, los sueros de los ratones de cada grupo se mezclaron y se inactivaron por calor a 56 °C durante 30 minutos. Para someter a prueba si sueros con KLH-SHe pueden proteger contra infecciones por el VRS, se administraron 40 μ l de sueros con KLH o KLH-SHe a ratones por vía intranasal un día antes (día -1) y un día después (día 1) de la exposición al VRS (2.10^5 UFC) (día 0). Como controles adicionales se incluyeron ratones que fueron tratados con PBS. El peso de todos los ratones se monitorizó diariamente (Figura 19C). Cinco días después de la infección, se sacrificaron los ratones para preparar homogeneizados de pulmón. El análisis del análisis de calvas demostró que los homogeneizados de pulmón de ratones que habían sido tratados con suero de KLH-SHe contenían aproximadamente 40 veces menos (proporción de medias de títulos víricos) virus replicante que los homogeneizados de pulmón originados de ratones tratados con suero de KLH (Figura 19 B). La observación de que el título de VRS en los pulmones de los ratones tratados con suero de KLH no difirió del título de VRS en los pulmones de los ratones tratados con PBS ilustra que la administración de suero de control no afecta a la replicación pulmonar del VRS en ratones.

Ejemplo 12: construcción de mHBc-SHeB

Aunque altamente conservadas dentro de su subtipo, las secuencias de aminoácidos de SHe de los virus B del VRS difieren de las de los virus del subtipo A del VRS. Por lo tanto, como protección contra los virus B del VRS, una vacuna basada en SHe los más probablemente deba incluir la secuencia de aminoácidos de SHe de VRS B.

Se construyó una vacuna con SHe de VRS B mediante unión química del péptido consenso de SHe del VRS B (SHeB: CGGGSNKLSEHKTFSENKLEQQQMYQINT (SEQ ID N° 51) con las partículas similivíricas de mHBc. Para promover el enlace químico, se le añadió un conector CysGlyGlyGlySer al extremo N del péptido de SHe del VRS B. Además, el residuo de cisteína presente en la SHe del VRS B natural se sustituyó por un residuo de serina. El

inmunógeno resultante del enlace químico del péptido de SHe del VRS B con mHBc se denominó mHBc-SHeB. Después de la purificación de las VLP mHBc-SHeB mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se analizó el grado de reticulación mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE y tinción con Commassie. La figura 20 ilustra que más de la mitad de los monómeros de HBc están reticulados con al menos un péptido de SHe.

Ejemplo 13: La inmunización de ratones con mHBc-SHeB induce AcM específicos contra SHeB que se unen a la superficie de células infectadas por VRS B.

Para someter a prueba si VLP mHBc-SHeB eran inmunógenas, se inmunizó a un ratón BALB/c por vía subcutánea tres veces con 20 µg de mHBc-SHeB combinado con 50 µl de Titermax (Sigma). Las tres inmunizaciones se realizaron con intervalos de dos semanas. Se realizaron sangrías un día antes de cada inmunización y dos semanas después de la inmunización final. Para someter a prueba si el antisuero de mHBc-SHeB puede reconocer proteínas SH de VRS B expresadas en la superficie de células infectadas, se infectaron células Vero bien con inóculos inactivados o con una cepa clínica de virus B del VRS (amablemente proporcionado por el Dr. Marc van Ranst, Universidad de Lovaina, Lovaina, Bélgica). Setenta y dos horas después de la infección, las células se fijaron y bien se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 % o no se permeabilizaron. A continuación, las células se tiñeron con antisuero de mHBc-SHeB (dilución 1/100) o antisuero de control (dilución 1/100) derivado de ratones BALB/c que habían sido vacunados con KLH (suero de KLH) en combinación con adyuvante incompleto de Freund. Las muestras se analizaron mediante microscopia de inmunofluorescencia o citometría de flujo. La figura 21A y B ilustra que el antisuero de mHBc-SHeB puede unirse a células infectadas por el VRS B permeabilizadas y no permeabilizadas pero no a células no infectadas. Por el contrario, el antisuero de control no se unió a células infectadas por el VRS B. Esto demuestra que la vacunación de ratones con mHBc-SHeB induce anticuerpos séricos que pueden reconocer células infectadas por el VRS B, lo más probablemente mediante la unión a la proteína SH del VRS B que se expresa en la superficie de células infectadas por el VRS B.

Ejemplo 14. La inmunización con mHBc-SHeB reduce la replicación del VRS en ratones.

Para someter a prueba si la vacunación con mHBc-SHeB puede proteger a los ratones de la infección por el VRS B, se inmunizaron dos grupos de 6 ratones con VLP de mHBc o mHBc-SHeB, con 50 µl de adyuvante incompleto de Freund como adyuvante. Como controles adicionales, se vacunaron seis ratones con PBS. Las vacunaciones se realizaron por vía intraperitoneal, tres veces con un intervalo de tres semanas. Se realizaron sangrías dos semanas después de cada inmunización. La inducción de anticuerpos específicos contra SHe se determinó mediante ELISA de péptidos usando SHeA o SHeB como péptidos de recubrimiento. Este análisis demostró que, en todos los ratones, tres inmunizaciones sucesivas con mHBc-SHeB indujeron títulos elevados de anticuerpos IgG específicos contra SHe del VRS B de ambos subtipos IgG1 e IgG2a (Figura 22A-C). El antisuero de mHBc-SHeB también se unió al péptido SHeA pero en una extensión mucho menor (Figura 22A, B y D).

Experimentos previos en nuestro laboratorio y en otros laboratorios han ilustrado que se puede rescatar nada o muy poco del virus replicante en los ratones infectados por el VRS B. No obstante, pudimos observar que las infecciones por cepas clínicas del VRS B inducen inflamación pulmonar y delgazamiento en ratones BALB/c (datos no mostrados). Por lo tanto, sometimos a prueba si la vacunación con mHBc-SHeB podía proteger a los ratones de la inflamación pulmonar inducida por el VRS B. Seis días después de la exposición intranasal de ratones con $2 \cdot 10^6$ UFC de una cepa clínica del VRS B, se realizó un lavado broncoalveolar (LBA). Se usaron ratones infectados con inóculos inactivados como control negativo para el análisis de la infiltración celular en el LBA. El líquido del LBA se analizó para determinar la infiltración de células inmunitarias mediante citometría de flujo, como se describe en Bogaert et al., 2011. La figura 22E-F muestra que la infección por el VRS B da como resultado la infiltración pulmonar de células inmunitarias, especialmente linfocitos T CD8⁺ que son conocidos como responsables de la morbilidad inducida por el VRS en ratones. Sin embargo, en comparación con los ratones vacunados con PBS o mHBc, los ratones vacunados con mHBc-SHeB mostraron una infiltración celular pulmonar significativamente menor. Estos datos demuestran que la vacunación con mHBc-SHeB reduce la patología inmunitaria relacionada con el VRS.

Ejemplo 15: diseño, expresión y purificación de la proteína LPP₍₅₎-SHe.

Como supercóntigo de proteínas alternativo para presentar SHe como un pentámero, usamos la cremallera de triptófano pentamérica descrita por Liu et al. (LPP₍₅₎), que se deriva de la lipoproteína LPP-56 de *E. coli* (Liu et al., 2004). La secuencia codificante de la cremallera de triptófano LPP₍₅₎ se fusionó genéticamente con la secuencia codificante de SHe y se clonó en un vector de expresión de *E. coli* (pLH36) que contenía un péptido de hexahistidina y un sitio de escisión de caspasa como se describe en Mertens et al., 1995. Este plásmido de expresión se denominó pLH36-HisDEVD-LPP-SHe (SEQ ID N° 49). La expresión de este plásmido da la proteína LPP₍₅₎-SHe química (SEQ ID N° 52) (MH⁵HHHHHPGGS⁵DEVD⁵AKWDQWSSDWQTWNAKWDQWSNDWN⁵AWRS⁵DWQ⁵

AKDDWARWNQRWDNWATGGNKLCEYNVFHNKTFELPRARVNT, la secuencia His-tag está subrayada, los conectores están en cursiva, el sitio de escisión de caspasa DEVD está en cursiva + subrayado, la cremallera de triptófano LPP pentamérica está en negrita y el ectodominio de SH del VRS A está en negrita + cursiva). Después de la inducción de la expresión en *E. coli*, la proteína LPP₍₅₎-SHe se purificó por cromatografía posterior de afinidad con níquel, intercambio aniónico y filtración en gel. La figura 23 demuestra que la proteína LPP₍₅₎-SHe se puede reconocer por anticuerpos monoclonales 3G8 específicos contra She, tanto en un extracto celular en bruto (23A) como en una proteína purificada (24B).

Ejemplo 16: Inmunización de ratas algodoneras

Para someter a prueba la eficacia de la vacuna en un modelo animal independiente, se usan ratas algodoneras. Las ratas algodoneras (*Sigmondon hispidus*) son susceptibles a la infección por el VRS (Prince et al., 1978). Se usan cinco grupos de seis ratas algodoneras cada uno. Dos grupos de animales se inmunizan por vía intraperitoneal (i.p.) con 100 µg de KLH (control con vehículo) o 100 µg de KLH-SHe (es decir, un conjugado químico del péptido de SHe derivado de VRS-A con KLH como vehículo). Los antígenos de las vacunas con KLH y KLH-SHe se formulan con adyuvante incompleto de Freund y se usan para inmunizar ratas algodoneras los días 0, 21 y 42. Un tercer grupo de animales se inmuniza por vía intramuscular con VRS inactivado con formol (VRS-IF) en presencia de adyuvante de alumbre. El último grupo sirve como control positivo para la inducción de la enfermedad potenciada por la vacuna que se manifiesta tras la exposición posterior al VRS. Un cuarto grupo se infecta con $2,04 \times 10^5$ unidades formadoras de calvas por rata algodонера de VRS-Tracy el día 0 y sirve como control positivo para la protección contra la exposición posterior. Un quinto grupo de ratas algodoneras permanece sin tratamiento hasta el día de la exposición y sirvió como control para la exposición al VRS. La pauta de la vacunación se muestra en la figura 24.

Se recogen sueros antes de cada inmunización y en el día de la exposición. El día 63, se expusieron las ratas algodoneras por vía intranasal a $2,04 \times 10^5$ unidades formadoras de calvas de VRS-Tracy. El virus de la exposición se administra por vía intranasal en un volumen de 100 microlitros, mientras que los animales están ligeramente anestesiados con isoflurano. El día 68, se recoge suero y se sacrifican todos los animales para recoger los pulmones para la titulación del virus y el análisis histopatológico. Cada pulmón se divide en dos para realizar un análisis histopatológico y la titulación del virus. Los pulmones izquierdos se atan y se usan para el análisis histopatológico. Los lóbulos del pulmón derecho se lavan usando 3 ml de medio de Iscove con glicerina al 15 %. El líquido de lavado se conserva en hielo hasta la titulación. Además, se preparan lavados nasales con 2 ml (1 ml para cada narina) en el mismo medio.

La carga vírica en el pulmón y los lavados nasales se determina mediante análisis de calvas en células HEp2. Se infectan células durante 90 minutos con una dilución sucesiva de las muestras de lavado. Después de la retirada del inóculo, las células se cubren con metilcelulosa al 2 % en MEM que contiene antibióticos. Después de 6 días de incubación a 37 °C en una incubadora de CO₂, se contratiñen las calvas con una solución de cristal violeta al 0,1 %/formol al 10 % y se dejan a temperatura ambiente durante 24 horas.

Para el análisis histopatológico, el pulmón izquierdo se perfunde con formol tamponada neutro al 10 %. El tejido pulmonar fijo se procesa posteriormente con un micrótopo para producir secciones que se tiñen con hematoxilina y eosina y se puntúa por el grado de lesiones histopatológicas. Se analizan muestras de suero para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-SHe y anti-VRS mediante ELISA de péptidos y mediante un ensayo de microneutralización. Para el ELISA de péptidos, las placas se recubren durante la noche a 37 °C con 2 µg de péptido de SHe en 50 µl de tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6. Después del recubrimiento, se bloquean las placas con leche en polvo al 3 % (p/v) en PBS, seguido de la aplicación de diluciones sucesivas al 3 % en sueros de rata algodонера. Las IgG de rata algodoneras específicas contra SHe retenidas se detectan usando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante y sustrato de tetrametilbenzidina. El título de punto final de IgG contra péptido de SHe en las muestras se define como la dilución más alta para la cual la absorbancia es al menos dos veces más alta que la del suero previo a la inmunización.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinan para el VRS-A y -B en placas de microtitulación de 96 pocillos con células HEp2. Se mezclan diluciones sucesivas de las muestras de suero de una cantidad fija de virus de inóculo. El título de anticuerpos neutralizantes se define como la dilución sérica a la cual se observa una reducción >50 % del efecto citopático. Este efecto citopático se refiere a la destrucción de células y se determina visualmente después de que las células se fijen con formol tamponado neutro al 10 % y se tiñan con cristal violeta. Los resultados muestran que los animales, vacunados con KLH-SHe en adyuvante de Freund, desarrollan anticuerpos neutralizantes y están claramente protegidos, mientras que el control con vehículo no muestra ninguna protección.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Beeler, J.A., van Wyke Coelingh, K. (1989). Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *J. Virol.* 63, 2941-2950.
- Bocchini, J. A. Jr, Bernstein, H.H., Bradley, J.S., Brady, M.T., Byington, C.L., Fisher, M.C., Glode, M.P., Jackson, M.A., Keyserling, H.L., Kimberlin, D.W., Orenstein, W.A., Schutze, G.E., Willoughby, R.E., Dennehy, P.H., Frenck, R.W. Jr, Bell, B., Bortolussi, R., Clover, R.D., Fischer, M.A., Gellin, B., Gorman, R.L., Pratt, R.D., Lee, L., Read, J.S., Starke, J.R., Swanson, J., Baker, C.J., Long, S.S., Pickering, L.K., Ledbetter, E.O., Meissner, H.C., Rubin, L.G., Frantz, J. (2009). From the American Academy of Pediatrics: Policy statements-Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*, 124, 1694-16701.
- Boisgerault, F., Moron, G. and Leclerc, C. (2002). Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 1, 101-109.
- Bogaert, P., Naessens, T., De Koker, S., Hennuy, B., Hacha, J., Smet, M., Cataldo, D., Di Valentin, E., Piette, J., Tournoy, K.G. and Grooten, J. (2011). Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 300, L679-690.
- Clarke, B.E., Newton, S.E., Carroll, A.R., Francis, M.J., Appleyard, G., Syred, A.D., et al. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* 330, 381-384.
- De Filette, M., Min Jou, W., Birkett, A., Lyons, K., Schultz, B., Tonkyro, A., et al. (2005). Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology* 337, 149-161.
- De Filette, M., Martens, W., Roose, K., Deroo, T., Vervalle, F., Bentahir, M., Vandekerckhove, J., Fiers, W. and Saelens, X. (2008). An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J. Biol. Chem.*, 283, 11382-11387.
- Falsey, A.R., Cunningham, C.K., Barker, W.H., Kouides, R.W., Yue, J.B., Menegus, M., Weiner, L.B., Bonville, C.A., and Betts, R.F. (1995). Respiratory syncytial virus and influenza A infection in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.* 172, 389-394.
- Falsey, A.R. and Walsh, E.E. (1996). Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in ambulatory adults over age 60. *Vaccine* 14, 1214-1218.
- Falsey, A.R. and Walsh, E.E. (1997). Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. *Vaccine*, 15, 1130-1132.
- Gimenez, H.B., Keir, H.M. and Cash, P. (1987) Immunoblot analysis of the human antibody response to respiratory syncytial virus infection. *J. Gen. Virol.* 68, 1267-1275.
- Groothuis, J.R., King, S.J., Hogerman, D.A., Paradiso, P.R. and Simoes, E.A. (1998). Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PFP-2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia. *J. Infect. Dis.* 177, 467-469.
- Hacking D. and Hull, J. (2002). Respiratory Syncytial virus - viral biology and the host response. *J. Infection* 45, 18-24.
- Hermanson, G.T. (1996). Bioconjugate techniques. Academic Press, Inc. 525 B street, San Diego, CA and Academic Press Limited, Oval Road, London, UK. ISBN-0-12- 342335-X.

- Jegerlehner, A., A. Tissot, F. Lechner, P. Sebbel, I. Erdmann, T. Kundig, T. Bachi, T. Storni, G. Jennings, P. Pumpens, W.A. Renner, and M.F. Bachmann. (2002). A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*. 20:3104-12.
- 5 - Kapikian, A.Z., Mitchell, R.H., Chanock, R.M., Shvedoff, R.A. and Stewart, C.E. (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89, 405-421.
- Karron, R.A., Wright, P.F., Belshe, R.B., Thumar, B., Casey, R., Newman, F., Polack, F.P., Randolph, V.B., Deatly, A., Hackell, J., Gruber, W., Murphy, B.R. and Collins, P.L. (2005). Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J. Inf. Dis.* 191, 1093-1104.
- 10 - Liu, J., W. Yong, Y. Deng, N.R. Kallenbach, and M. Lu. (2004). Atomic structure of a tryptophan-zipper pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16156-61.
- 15 - Liu, J., Q. Zheng, Y. Deng, N.R. Kallenbach, and M. Lu. (2006). Conformational transition between four and five-stranded phenylalanine zippers determined by a local packing interaction. *J Mol Biol.* 361 :168-79.
- Malashkevich, V.N., Kammerer, R.A., Efimov, V.P., Schulthess, T. and Engel, J. (1996). The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? *Science* 274, 761-765.
- 20 - McFarlane, A. A., Orriss, G.L. and Stetefeld, J. (2009). The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems. *Eur. J. Pharmacol.* 625, 101-107.
- 25 - Mertens, N., Remaut, E. and Fiers W. (1995). Versatile, multi-featured plasmids for high-level expression of heterologous genes in *Escherichia coli*: overproduction of human and murine cytokines. *Gene*, 164, 9-15.
- Meyer, G., Deplanche, M. and Schelcher, F. (2008). Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 31 , 191-225.
- 30 - Murata, Y. (2009) Respiratory Syncytial Virus vaccine development. *Clin. Lab. Med.* 29, 725-739.
- Neiryck, S., T. Deroo, X. Saelens, P. Vanlandschoot, W.M. Jou, and W. Fiers. (1999). A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med.* 5: 1157-63.
- 35 - Norton, E.B., J.D. Clements, T.G. Voss, and L. Cardenas-Freytag. (2010) Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol.* 84:2983-95.
- 40 - Orga, P.L. (2004). Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Pediatric respiratory reviews*, 5, suppl.A, S119-S126.
- Olmsted, R.A., and P.L. Collins. (1989). The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol.* 63:2019-29
- 45 - Power, U.F., Nguyen, T.N., Rietveld, E., de Swart, R.L., Groen J., Osterhaus, A.D., de Groot, R., Corvaia, N., Beck, A., Bouveret-le-Cam, N and Bonnefoy, J.Y. (2001). Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit Respiratory Syncytial Virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 184, 1456-1460.
- 50 - Prescott, W.A. Jr., Doloresco, F., Brown. J. and Paladino, J.A. (2010). Cost effectiveness of respiratory syncytial virus prophylaxis: a critical and systematic review. *Pharmacoeconomics*, 28, 279-293.
- Prince GA, Jenson AB, Horswood RL, Camargo E, Chanock RM., The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats, *American Journal of Pathology*, 1978, 93, 771-791.
- 55 - Prince, G.A., Jenson, A.B., Hemming, V.G., Murphy, B.R., Walsh, E.E., Horswood, R.L., et al. (1986) Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin-inactivated virus. *J Virol* 57, 721-728.

- Schepens, B., S.A. Tinton, Y. Bruynooghe, R. Beyaert, and S. Cornells. (2005). The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1 alpha IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 33:6884-94.
- 5 - Schmidt, A.C., Wenzke, D.R., McAuliffe, J.M., St Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. and Collins, P.L. (2002). Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by living cDNA- derived vaccine based on a host-range attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *J. Virol.* 76, 1089-1099.
- Shu, W., Liu, J., Ji, H. and Lu, M. (2000). Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 299, 1101-11 12.
- 10 - Slütter, B., Soema, P.C., Ding, Z., Verheul, R., Hennink, W. And Jiskoot, W. (2010). Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen. *J. Controlled Release*, 143, 207-214.
- Timmerman, P, Puijk, W.C. and Meloen, R.H. (2007). Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS™ technology. *L. Mol. Recognition* 20, 283-299.
- 15 - Tsutsumi, H., Honjo, T., Nagai, K., Chiba, Y., Chiba, S., and Tsuguwa, S. (1989). Immunoglobulin A antibody response to respiratory syncytial virus structural proteins in colostrums and milk. *J. Clinical Microbiol.* 27, 1949-1951.
- 20 - Whitacre, D.C., Lee, B.O. and Milich, D.R. (2009). Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. *Expert Rev Vaccines.* 8, 1565-1573. Schepens, B., S.A. Tinton, Y. Bruynooghe, R. Beyaert, and S. Cornells. 2005. The translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 33:6884-94.
- 25 - Williams, J. P., D.C. Smith, B.N. Green, B.D. Marsden, K.R. Jennings, L.M. Roberts, and J.H. Scrivens. (2006). Gas phase characterization of the noncovalent quaternary structure of cholera toxin and the cholera toxin B subunit pentamer. *Biophys J.* 90:3246-54.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> VIB VZW
UNIVERSITEIT GENT
- <120> VACUNA CONTRA EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL
- 35 <130> XaSa/VRS/359
- <150> GB 1019240.9
- <151> 15-11-2010
- 40 <150> US 61/458,012
- <151> 15-11-2010
- <160> 54
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 23
- 50 <212> PRT
- <213> virus respiratorio sincicial
- <400> 1
- Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu
- 1 5 10 15
- Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
- 20
- 55 <210> 2

<211> 24
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial

5 <400> 2
 Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Cys Asn Asn Thr Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Gly Gln Met His Gln Ile Asn Thr
 20

<210> 3
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Variante de ectodominio

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser Cys o Ser

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser Tyr o His

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Asn o Lys

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

35 <400> 3
 Asn Lys Leu Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Phe
 1 5

<210> 4
 40 <211> 23
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial

<400> 4
 Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Ile Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu
 1 5 10 15

Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
 20

45 <210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 50 <213> virus respiratorio sincial

ES 2 714 392 T3

<400> 5

Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu
1 5 10 15

Pro Lys Ala Arg Val Asn Thr
20

<210> 6

5 <211> 23

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 6

Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe Tyr Asn Lys Thr Phe Glu Leu
1 5 10 15

10 Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr

20

<210> 7

15 <211> 23

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 7

Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Ala Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu
1 5 10 15

20 Pro Arg Ala Arg Ile Asn Thr
20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

25 <213> virus respiratorio sincial

<400> 8

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Leu
1 5 10 15

Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 9

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Gln
1 5 10 15

Gly Gln Met Tyr Gln Val Asn Thr
20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 10

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Ala Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Gln
1 5 10 15

Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
20

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 11

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Ile Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Gln
1 5 10 15

Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
20

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 12

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Pro Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Gln
1 5 10 15

Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 13

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Gln
1 5 10 15

Gly Gln Val Tyr Gln Ile Asn Thr
20

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 14

Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Tyr Asn Lys Thr Leu Glu Gln
1 5 10 15

Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
20

<210> 15
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial
 5
 <400> 15
 Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Ile Phe Cys Asn Lys Thr Leu Glu Gln
 1 5 10 15

 Gly Gln Met Tyr Gln Ile His Thr
 20
 10
 <210> 16
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial

 <400> 16
 Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Phe Asn Lys Thr Leu Glu Gln
 1 5 10 15

 Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
 20
 15

 <210> 17
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial
 20

 <400> 17
 Asn Lys Leu Cys Asp Phe Asn Asp His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
 1 5 10 15

 Arg Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Leu Ile Thr Arg Ala His Glu
 20 25 30

 Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
 35 40
 25
 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Variante de ectodominio

 <220>
 <221> misc_feature
 35
 <222> (5)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <400> 18
 Asn Lys Leu Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Thr Asn Ser Leu
 1 5 10
 40

 <210> 19
 <211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 19

Asn Lys Leu Cys Asp Phe Asn Asp Arg His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Arg Leu Arg Asp Asp Thr Gln Leu Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 20

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 20

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asp His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Leu Thr Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Pro Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 21

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 21

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 22

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 22

ES 2 714 392 T3

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asp His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Lys Leu Arg Ser Asp Thr Gln Leu Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Glu Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 23

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 23

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Lys Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 24

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 24

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Lys Thr Arg Leu Lys Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 25

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 25

Asn Lys Leu Cys Val Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 26

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 26

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Glu Ile
1 5 10 15

Lys Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Lys Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

5

<210> 27

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

10

<400> 27

Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Lys Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Thr Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

15

<210> 28

<211> 40

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 28

Asn Lys Leu Cys Val Leu Ser Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

20

Gly Ser Ile Asn Gln Ser Ser Asn
35 40

<210> 29

25

<211> 36

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

<400> 29

Asn Lys Leu Cys Val Leu Asn Asn His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
1 5 10 15

Arg Thr Arg Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His Glu
20 25 30

30

Gly Ser Ile Asn
35

<210> 30
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial
 5
 <400> 30
 Asn Lys Leu Cys Asp Leu Asn Asp His His Thr Asn Ser Leu Asp Ile
 1 5 10 15
 Arg Thr Gly Leu Arg Asn Asp Thr Gln Ser Ile Thr Arg Ala His
 20 25 30
 10
 <210> 31
 <211> 2973
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Plásmido puc57-comp5SHe
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (440)..(442)
 20 <223> Marco de lectura de codón de iniciación Flag-COMPcc-SHe
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (671)..(673)
 25 <223> Marco de lectura de codón de finalización Flag-COMPcc-SHe
 <400> 31
 tcgcgcggtt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

ES 2 714 392 T3

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcmc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggc acctcgcgaa	420
tgcattctaga tattggcata tggattacaa agatgatgat gataaagatc tggccccaca	480
gatgctgctg gaactgcagg aaaccaatgc agccctgcag gatgttcgtg aactgctgcm	540
tcaccgtgtg aaagaaatta ccttcctgaa aaatacggtc atggaatgtg acgcttgcmg	600
caacaaactg tgcgaatata atgtttttca taataaaacc tttgaactgc ctgctgcacg	660
tgtgaacacc taaaagctta tgcattcgcc cgcattggga tcccggggcc gtcgactgca	720
gaggcctgca tgcaagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt	780
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg	840
cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcmctc actgcccgtc ttccagtcgm	900
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc	960
gtattgggcm ctcttcgctc tctcgcctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc	1020
ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcmg taatacggct atccacagaa tcaggggata	1080
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaacct aaaaaggcmg	1140
cgttgctgcm gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgtc	1200
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa	1260
gtccctcgtc gcgctctcct gttccgaccc tgcgcttac cggatacctg tccgccttcc	1320
tcccttcggg aagcgtggcm ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt	1380
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcm	1440
ccttatccgm taactatcgt cttgagtcga acccgtaag acacgactta tcgccactgm	1500
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgt acagagttct	1560
tgaagtggcg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc	1620
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg	1680
ctggtagcmg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc	1740
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt	1800
aagggaatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa	1860
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat	1920
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcmg tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct	1980
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggaggggct accatctggc cccagtgctg	2040

ES 2 714 392 T3

caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2100
 ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2160
 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg 2220
 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2280
 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 2340
 ccttcgggcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca ctcatgttta 2400
 tggcagcact gcataattct cttactgtca tggcatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2460
 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgatgctg gcgaccgagt tgctcttgcc 2520
 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 2580
 gaaaacgttc ttccggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 2640
 tgtaaccac tccgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2700
 ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat 2760
 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 2820
 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataagg gttccgcgca 2880
 catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct 2940
 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtc 2973

<210> 32

<211> 525

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> vector de expresión de mHBc

10

<400> 32

gggcgaattg ggtaccggaa ttccatatgg atatcgatcc gtacaaagaa tttggcgcga 60
 ccgtggaact gctgtctttt ctgccgagcg atttttttcc gagcgtgcgt gatctgctgg 120
 ataccgcgag cgcgctgtat cgtgaagcgc tggaaagccc ggaacatagc agcccgcatc 180
 ataccgcgct gcgtcaggcg attctgtgct ggggcgaact gatgacctg gccacctggg 240
 tgggcgtgaa cctggaagat ggccggcaaag gcggcagccg tgatctggtg gtgagctatg 300
 tgaacaccaa catgggcctg aaatttcgtc agctgctgtg gtttcatatc agcagcctga 360
 cctttggccg tgaaaccgtg ctggaatata tggtagcctt tggcgtgtgg attcgtactc 420
 cgccggcata tcgtccgcg aacgcgccga ttctgagcac cctgccggaa accaccgtgg 480
 tgtgctagcg gccgcaaaag gaaaagagct ccagcttttg ttccc 525

<210> 33

<211> 358

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> vector de expresión de SHe

<400> 33
 gggcgaattg ggtaccctgc agaaccacgt ggggtgggtgt taacttggaa gatggcgcca 60
 gcaacaaact gtgcgaatat aacgtgttcc acaataaaac ctttgaactg ccgctgcgc 120
 gtgtgaatac cagcggcggc agcgggtggt cgaataaact gtgtgaatac aatgtctttc 180
 ataacaagac gttcgaactg ccacgtgccc gcgtcaacac ctctggtggt agcggcggct 240
 ctaacaagtt atgtgagtac aacgtattcc acaacaagac atttgagttg cctcgggcac 300
 gagtaatac atctggtggt gctagcaggg acctggtaga gctccagctt ttgttccc 358

5

<210> 34
 <211> 3250
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Plásmido de molde

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3150)..(3150)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 34
 atgaacaatg ctaccttcaa ctatacaaac gttaacccta tttctcacat caggggaggt 60
 ttaaaacaaa tcgaagacaa gctggaagaa atcctttcga aactgtacca catcgaaaac 120
 gagctggcca ggatcaagaa actgctgggc gaagaattcg aaggaatgga ctacaaggat 180
 catgatggtg attataaaga ccacgacatt gactataagg atgatgatga caaataggaa 240
 gcttatgcat gcggccgcat ctagagggcc cggatccctc gaggtcgacg aattcgagct 300
 cggccgactt ggccttcctt ttagtgaggg ttaataaact tgggtagcaa taactagcat 360
 aacccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga ggaactatat 420
 gcgctcatac gatatgaacg ttgagactgc cgctgagtta tcagttagca ataactagca 480
 taacccttgg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata 540
 tccggccgga tagcttatcg ctagaggctg aaattcacct cgaaagcaag ctgataaacc 600
 gatacaatta aaggctcctt ttggagcctt tttttttgga gatattcaac gtgaaaaaat 660
 tattattcgc aattccaagc taattcacct cgaaagcaag ctgataaacc gatacaatta 720
 aaggctcctt ttggagcctt tttttttgga gatattcaac gtgaaaaaat tattattcgc 780
 aattccaagc tctgcctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg aaacacctg acacatgcag 840

20

ES 2 714 392 T3

ctccctaggc aattgcatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	900
cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	960
ctcaagtacg aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg	1020
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt	1080
tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcgg	1140
gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg	1200
cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact	1260
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcgggtg ctacagagtt	1320
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct	1380
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac	1440
cgtcggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc	1500
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg	1560
ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta	1620
aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca	1680
atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc	1740
ctgactcccc gtctgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtc	1800
tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc	1860
agccggaagg gccgagcgca gaagtgtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat	1920
taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt	1980
tgccattgct gcaggcatcg ttggtgtcacg ctctgtgttt ggtatggctt cattcagctc	2040
cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtag	2100
ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagtggcc gcagtgttat cactcatggt	2160
tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac	2220
tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg	2280
cccggcgta acacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat	2340
tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc	2400
gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc	2460
tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaag ggaataaggg cgacacggaa	2520
atgttgaaata ctcatactct tcctttttca atattatgta agcagacagt tttattgttc	2580
atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt aacatcagag attttgagac acaacgtggc	2640
tttgttgaat aaatcgaact tttgctgagt tgaaggatca gatcacgcat cttcccgaca	2700
acgcagaccg ttccgtggca aagcaaaagt tcaaaatcac caactggtcc acctacaaca	2760

ES 2 714 392 T3

aagctctcat caaccgtggc tccctcactt tctggctgga tgatggggcg attcaggcct 2820
 ggtatgagtc agcaacacct tcttcacgag gcagacctca gcgccggtga tgccggccac 2880
 gatgcgtccg gcgtagagga tctctcacct accaaacaat gccccctgc aaaaaataaa 2940
 ttcatataaa aaacatacag ataaccatct gcggtgataa attatctctg gcggtgttga 3000
 cataaatacc actggcgggtg atactgagca catcagcagg acgcactgac caccatgaag 3060
 gtgacgctct taaaattaag ccctgaagaa gggcagcatt caaagcagaa ggctttgggg 3120
 tgtgtgatac gaaacgaagc attggaattn cggatctcga tcccggaaat taatacgact 3180
 cactataggg agaccacaac ggtttccctc tagaaataat tttgtttaac tttaagaagg 3240
 agatatacat 3250

<210> 35

<211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vacuna con Flag-COMPcc-SHe

<400> 35

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu
 20 25 30

Leu Arg His Gln Val Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met
 35 40 45

Glu Cys Asp Ala Cys Gly Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe His
 50 55 60

Asn Lys Thr Phe Glu Leu Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
 65 70 75

<210> 36

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 36

ataagaaagc ggccgctatg gaaaatacat ccataacaat ag 42

<210> 37

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 37
5 **gaagatctct atgtgttgac tcgagctctt ggtaactcaa a** 41

<210> 38
<211> 35
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

15 <400> 38
ggaattccat atgaacaagt tatgtgagta caacg 35

20 <210> 39
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 39
30 **gatttgttt aaacctctg tatttactcg tgcccgaggc aa** 42

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
35 <213> virus respiratorio sincial

<400> 40
Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu
1 5 10 15

Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
20

40 <210> 41
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador

<400> 41
50 **cccaagcttc taacattgag attcccgaga ttgaga** 36

<210> 42
<211> 24
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 42
 5 **tattaaccct cactaaaggg aagg** 24

 <210> 43
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 43
ggaattccat atgaacaagt tatgtagta caacg 35

 <210> 44
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 44
tattaaccct cactaaaggg aagg 24

 <210> 45
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador

 <400> 45
tcacgaaggc tccacatata 20

 40 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador

 <400> 46
 50 **gcaggggtcat cgtcttttc** 20

 <210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 47

tgaagcaggc atctgaggg 19

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 48
cgaaggtgga agagtgggag 20

<210> 49
<211> 3252
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plásmido pLH36-HisDEVD-LPP₍₅₎-SHe

<400> 49
gctgaaagga ggaactatat ccggccggat agcttatcgc tagaggtcga aattcacctc 60
gaaagcaagc tgataaaccg atacaattaa aggctccttt tggagccttt ttttttggag 120
attttcaacg tgaaaaaatt attattcgca attccaagct aattcacctc gaaagcaagc 180
tgataaaccg atacaattaa aggctccttt tggagccttt ttttttggag attttcaacg 240
tgaaaaaatt attattcgca attccaagct ctgcctcgcg cgtttcggtg atgacggtga 300
aaacctctga cacatgcagc tccctaggca attgcatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 360
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 420
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 480
accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta 540
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct 600
gtaggatatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 660
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa 720
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 780
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag 840
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt 900
gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 960
cgcgacagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc 1020

ES 2 714 392 T3

agtggAACGA aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca 1080
 cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa 1140
 cttgggtctga cagttaccaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat 1200
 ttctgttcac catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggtct 1260
 taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt 1320
 tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat 1380
 ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta 1440
 atagtttgcg caacgttggt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tctctgtttg 1500
 gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 1560
 tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg 1620
 cagtgttacc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg 1680
 taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc 1740
 ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa 1800
 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac 1860
 cgtgtttgag atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt 1920
 ttactttcac cagcgtttct ggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 1980
 gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattatgtaa 2040
 gcagacagtt ttattgttca tgatgatata tttttatctt gtgcaatgta acatcagaga 2100
 ttttgagaca caacgtgggt ttgttgaata aatcgaactt ttgctgagtt gaaggatcag 2160
 atcacgcac ttcccgacaa cgcagaccgt tccgtggcaa agcaaaagtt caaaatcacc 2220
 aactgggtcca cctacaacaa agctctcatc aaccgtgggt ccctcacttt ctggctggat 2280
 gatggggcga ttcaggcctg gtatgagtca gcaacacctt cttcacgagg cagacctcag 2340
 cgcgggtgat gccggccacg atgcgtccgg cgtagaggat ctctcaccta ccaacaatg 2400
 cccccctgca aaaaataaat tcatataaaa aacatacaga taacctctg cggtgataaa 2460
 ttatctctgg cgggtgtgac ataaatacca ctggcgggtga tactgagcac atcagcagga 2520
 cgcactgacc accatgaagg tgacgctctt aaaattaagc cctgaagaag ggcagcattc 2580
 aaagcagaag gctttggggt gtgtgatacg aaacgaagca ttggaattcc ggatctcgat 2640
 cccggaaatt aatacgactc actataggga gaccacaacg gtttccctct agaaataatt 2700
 ttgtttaact ttaagaagga gatatacata tgcacatca ccatcaccat cccggcggct 2760
 cggacgaagt ggatgcgaaa tgggatcagt ggagcagcga ttggcagacc tggaacgcga 2820
 aatgggatca gtggagcaac gattggaacg cgtggcgag cgattggcag gcgtggaaag 2880
 atgattgggc gcgctggaac cagcgtggg ataactgggc gaccggcggc aacaaactgt 2940

ES 2 714 392 T3

gcgaatataa cgtgtttcat aacaaaacct ttgaactgcc gcgcgcgcgc gtgaacacct 3000
 agggatccct cgaggtcgac gaattcgagc tcggccgact tggccttccc tttagtgagg 3060
 gttaataaac ttggtgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg 3120
 aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tgcgctcata cgatatgaac gttgagactg 3180
 ccgctgagtt atcagtgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt 3240
 gaggggtttt tt 3252

<210> 50
 <211> 28
 5 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial

<400> 50
 Cys Gly Gly Gly Ser Asn Lys Leu Ser Glu Tyr Asn Val Phe His Asn
 1 5 10 15

Lys Thr Phe Glu Leu Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
 20 25

10 <210> 51
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial

15 <400> 51
 Cys Gly Gly Gly Ser Asn Lys Leu Ser Glu His Lys Thr Phe Ser Asn
 1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu Gln Gly Gln Met Tyr Gln Ile Asn Thr
 20 25

20 <210> 52
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> proteína LPP(5)-SHe química

<400> 52
 Met His His His His His His Pro Gly Gly Ser Asp Glu Val Asp Ala
 1 5 10 15

Lys Trp Asp Gln Trp Ser Ser Asp Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp
 20 25 30

Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala

ES 2 714 392 T3

35

40

45

Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Asn Gln Arg Trp Asp Asn Trp Ala
50 55 60

Thr Gly Gly Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe His Asn Lys Thr
65 70 75 80

Phe Glu Leu Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
85 90

<210> 53

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 53

gcgaaatggg atcagtggag cagc 24

<210> 54

15 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 54

aatataggat ccctaggtcg ccagttatc ccagcg 36

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para su uso en un procedimiento de vacunación contra la infección por el VRS, comprendiendo la vacuna una composición inmunógena y un adyuvante, **caracterizada por que** la composición inmunógena consiste en el ectodominio de la pequeña proteína hidrófoba de un virus respiratorio sincicial (VRS) y un vehículo, en la que el vehículo es una molécula que es heteróloga para la pequeña proteína hidrófoba del virus respiratorio sincicial (VRS) y en la que, además, dicho ectodominio está unido química o genéticamente al vehículo.
2. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ectodominio se presenta como un oligómero.
3. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho ectodominio consiste en SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2.
4. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho oligómero es un pentámero.
5. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho vehículo se selecciona del grupo que consiste en proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (comp), Lpp-56 y una partícula similivírica.
6. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho vehículo es un vehículo no proteínico.
7. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho vehículo no proteínico es un liposoma o un trimetilquitosano.
8. Un anticuerpo específico contra el ectodominio de la pequeña proteína hidrófoba del VRS, para su uso en un procedimiento para prevenir o tratar la infección por el VRS.
9. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en un procedimiento para prevenir o tratar la infección por el VRS.

Figura 1

A

Ectodominio de SH del VRSH A: NKLCEYNVFHNKTFELPRARVNT

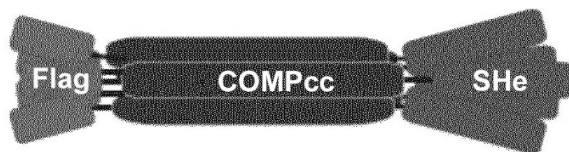
Ectodominio de SH del VRSH B: NKLSEHKTFCNNTLELGQMHQINT

Ectodominio de SH del VRSB: NKLCDFNDHHTNSLDIRTLRNDTQLITRAHEGSINQSSN

B

MDYKDDDDK *DLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHQVKEITFLKNTVMECDACG*
NKLCEYNVFHNKTFELPRARVNT

C



D

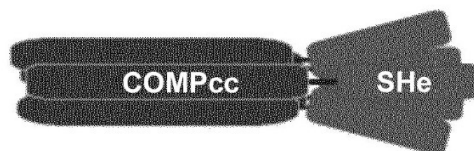
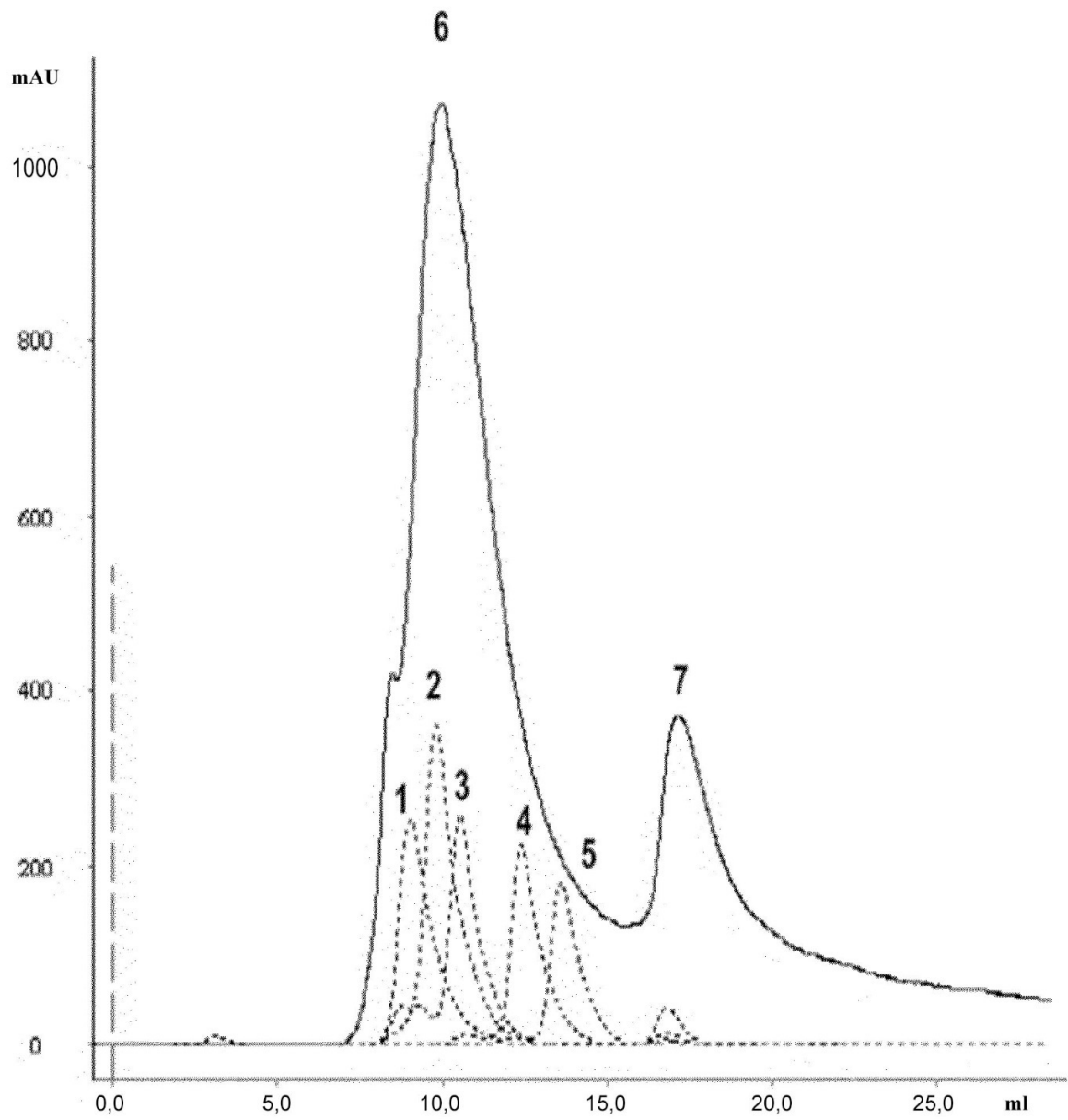
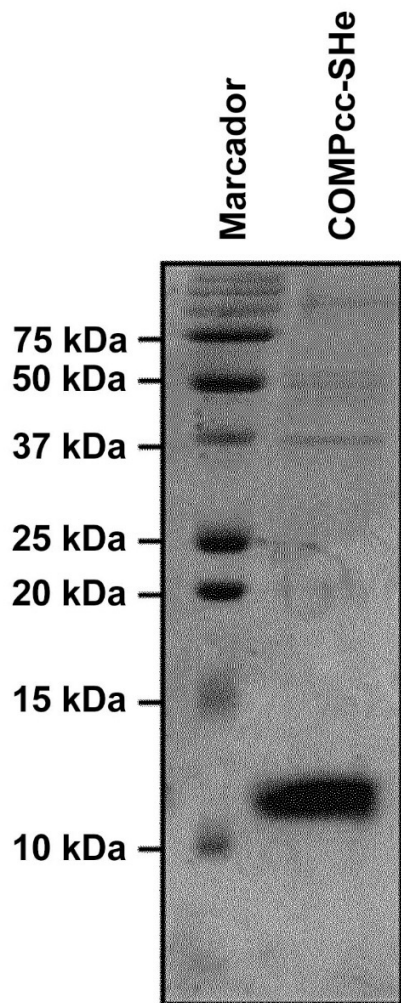


Figura 2

A



B



C

pico	proteína	Mr (kDa)	Ve (ml)	Kav = (Ve-V0)/Vtot-V0
Pico 1	Aldolase	158	9,05	0,000
Pico 2	Conalbúmina	75	9,85	0,070
Pico 3	Albúmina	43	10,5	0,138
Pico 4	Quimotripsinógeno	25	2,4	0,312
Pico 5	Ribonucleasa a	13,7	13,6	0,423
Pico 6	Flag-COMPcc-SHe	63,0	10,3	0,091

D

Curva de calibración de Superdex 75 HR 10/30

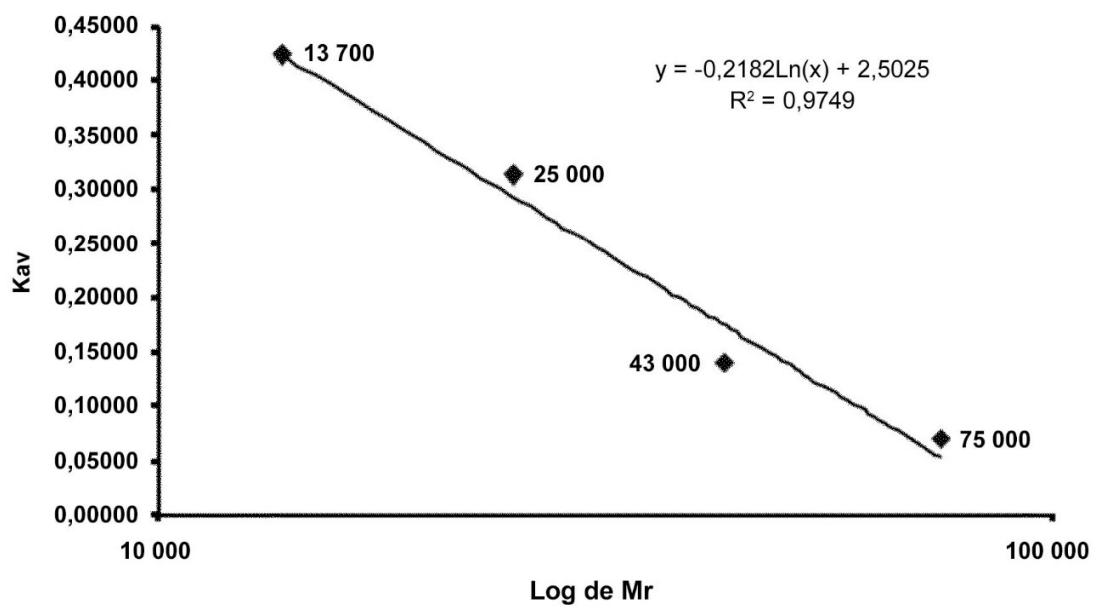
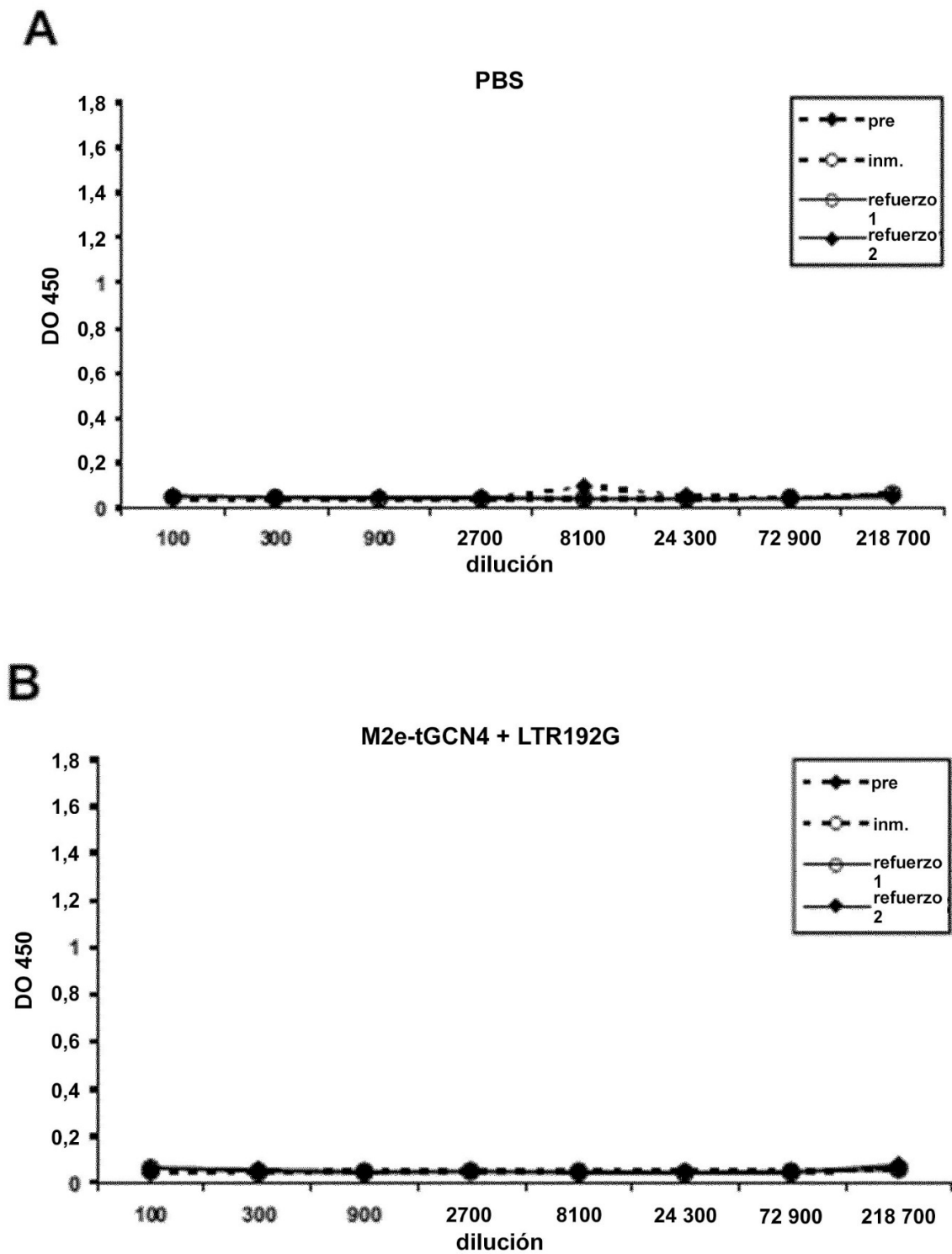
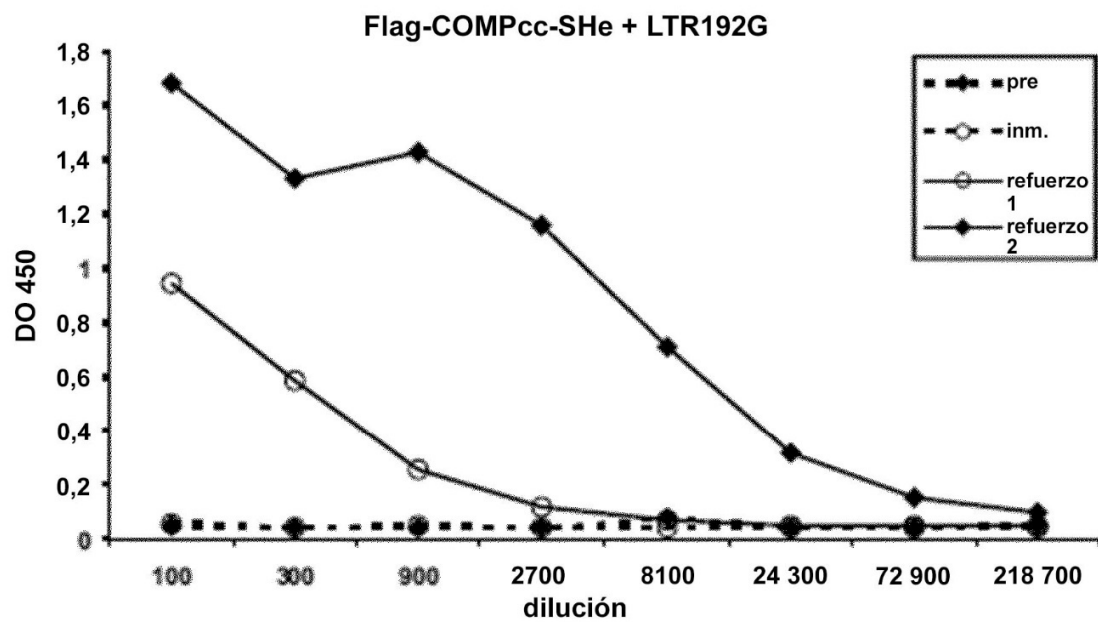


Figura 3



C



D

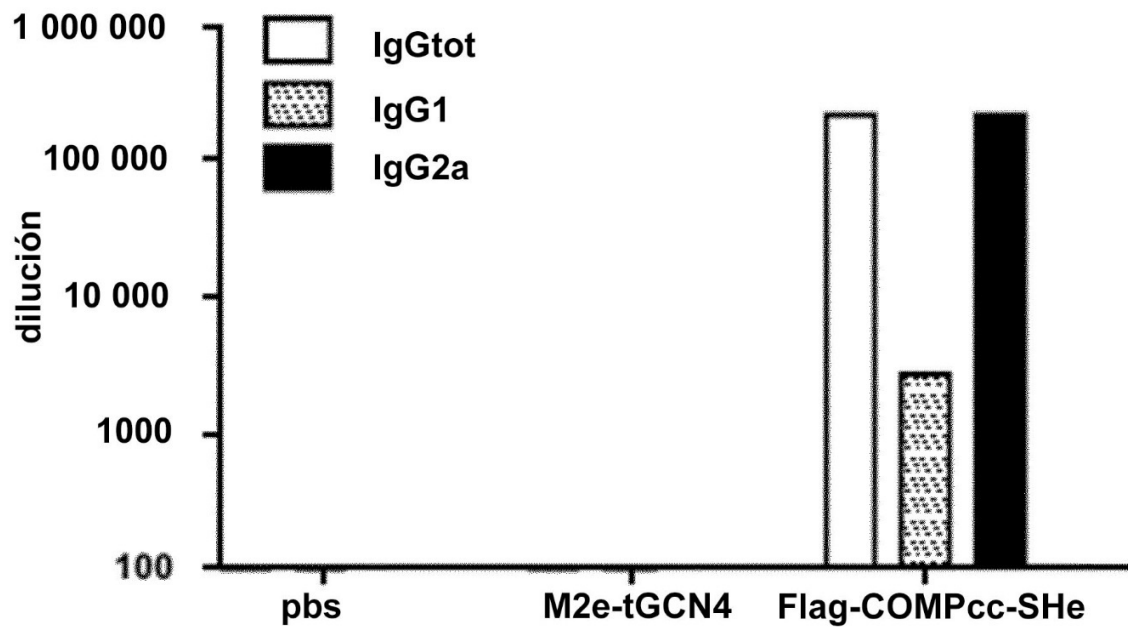
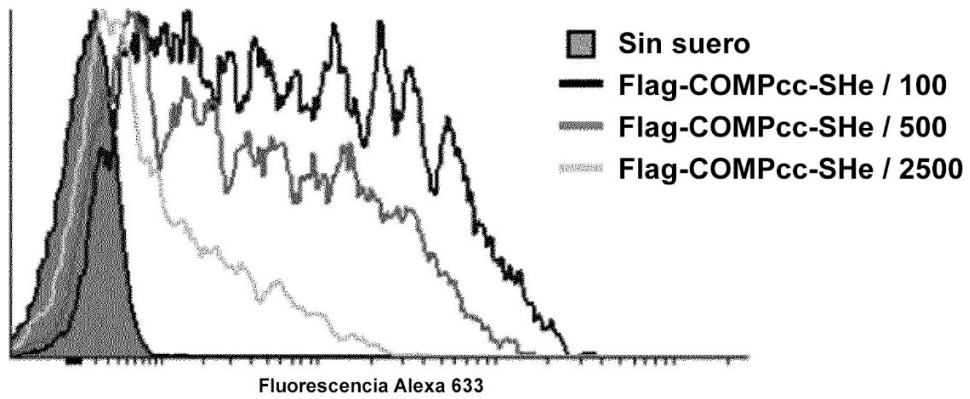


Figura 4

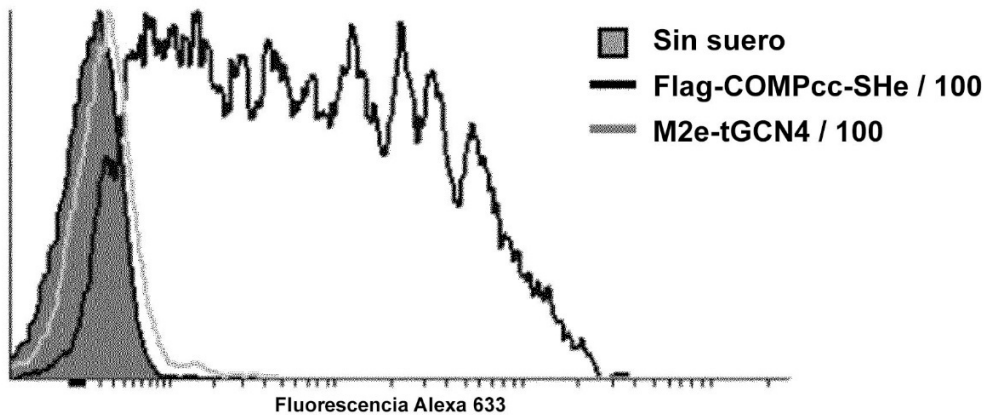
A

Células Hek-GFP-SHe



B

Células Hek-GFP-SHe



C

Células Hek-GFP-Luc.

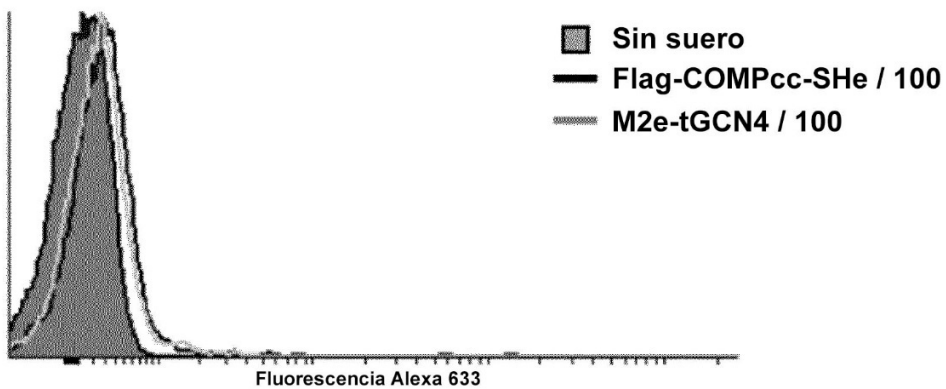


Figura 5

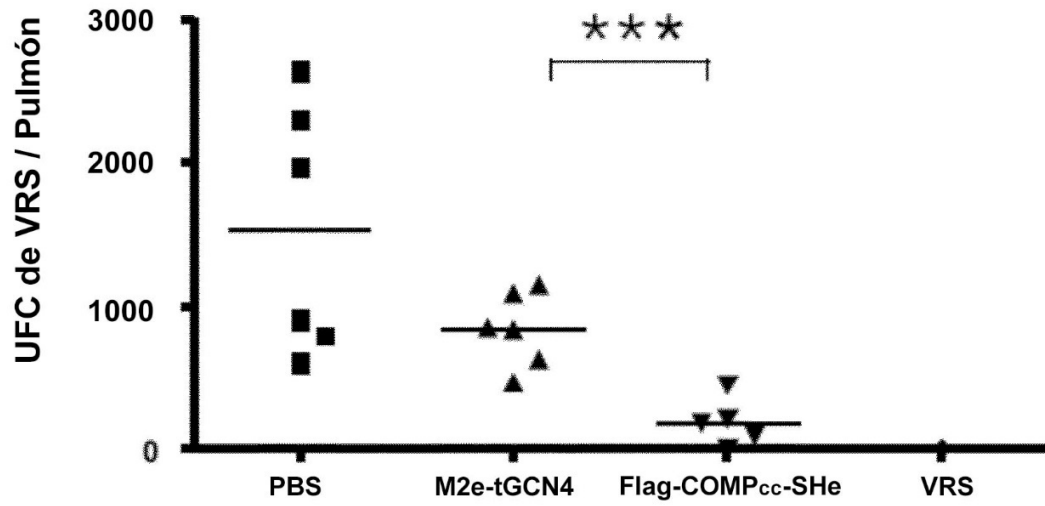


Figura 6

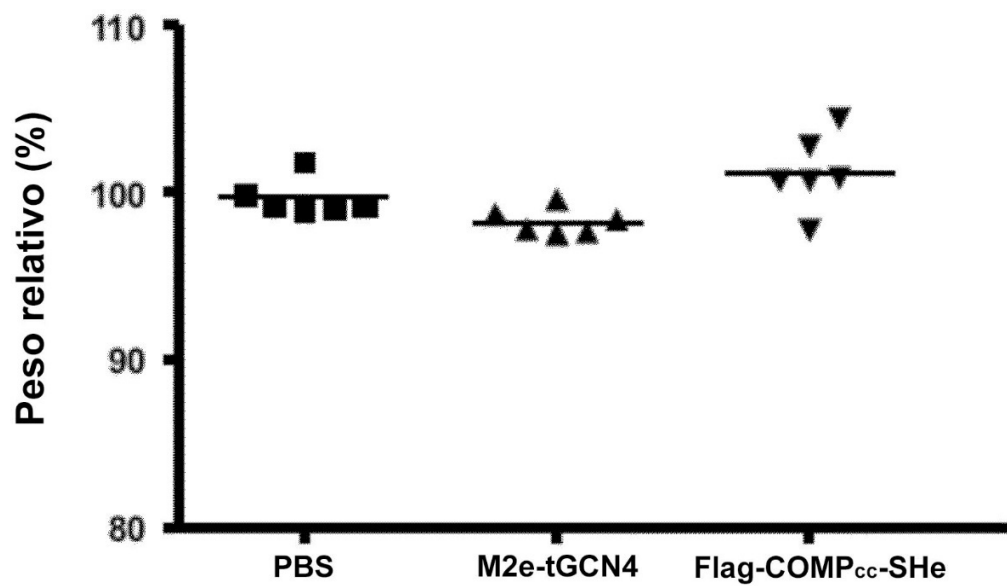


Figura 7

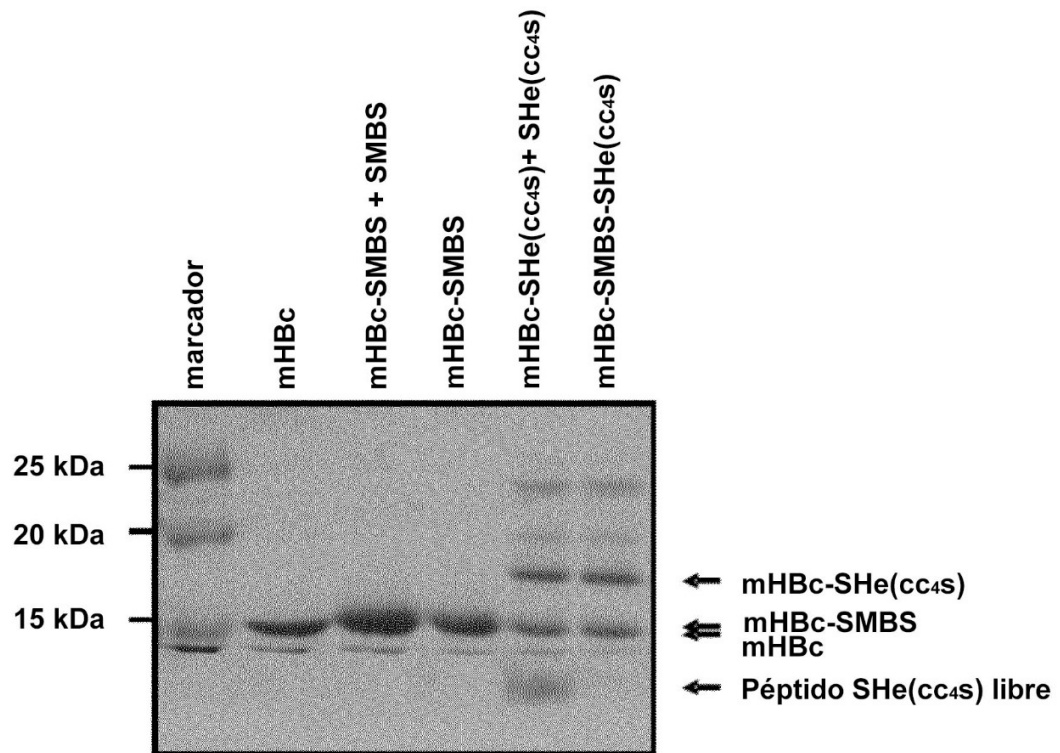


Figura 8

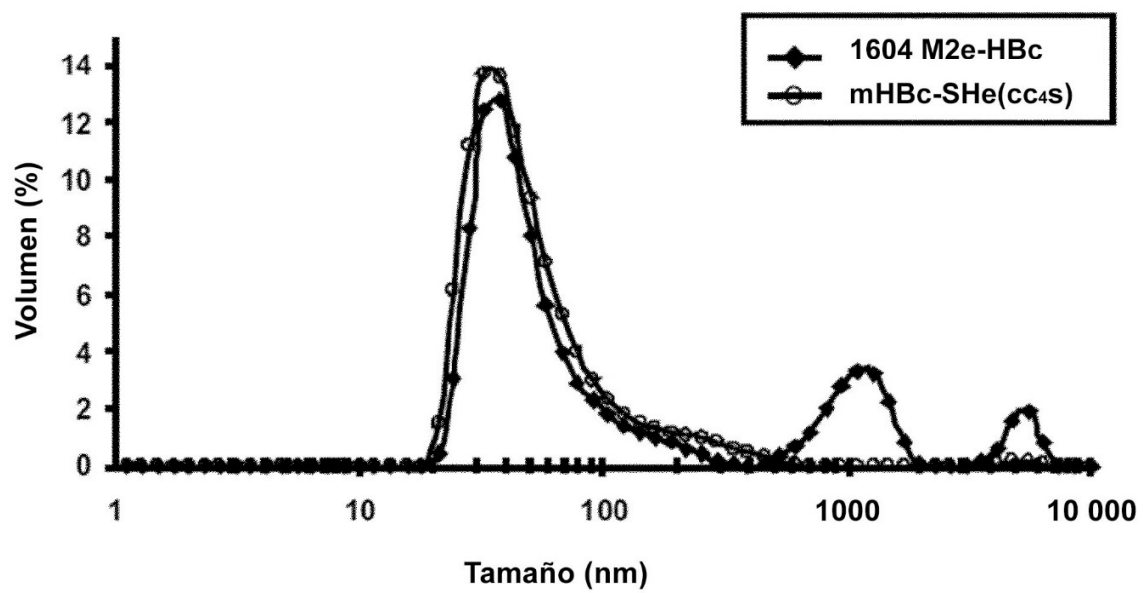


Figura 9

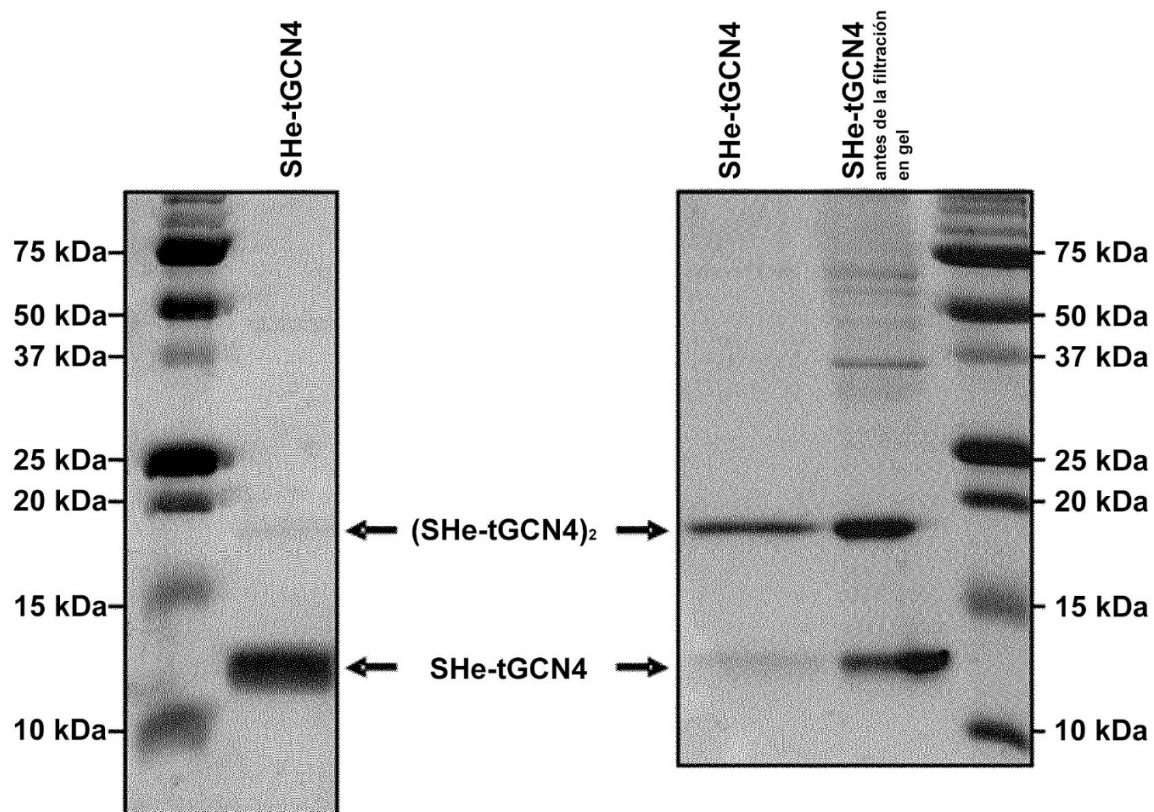


Figura 10

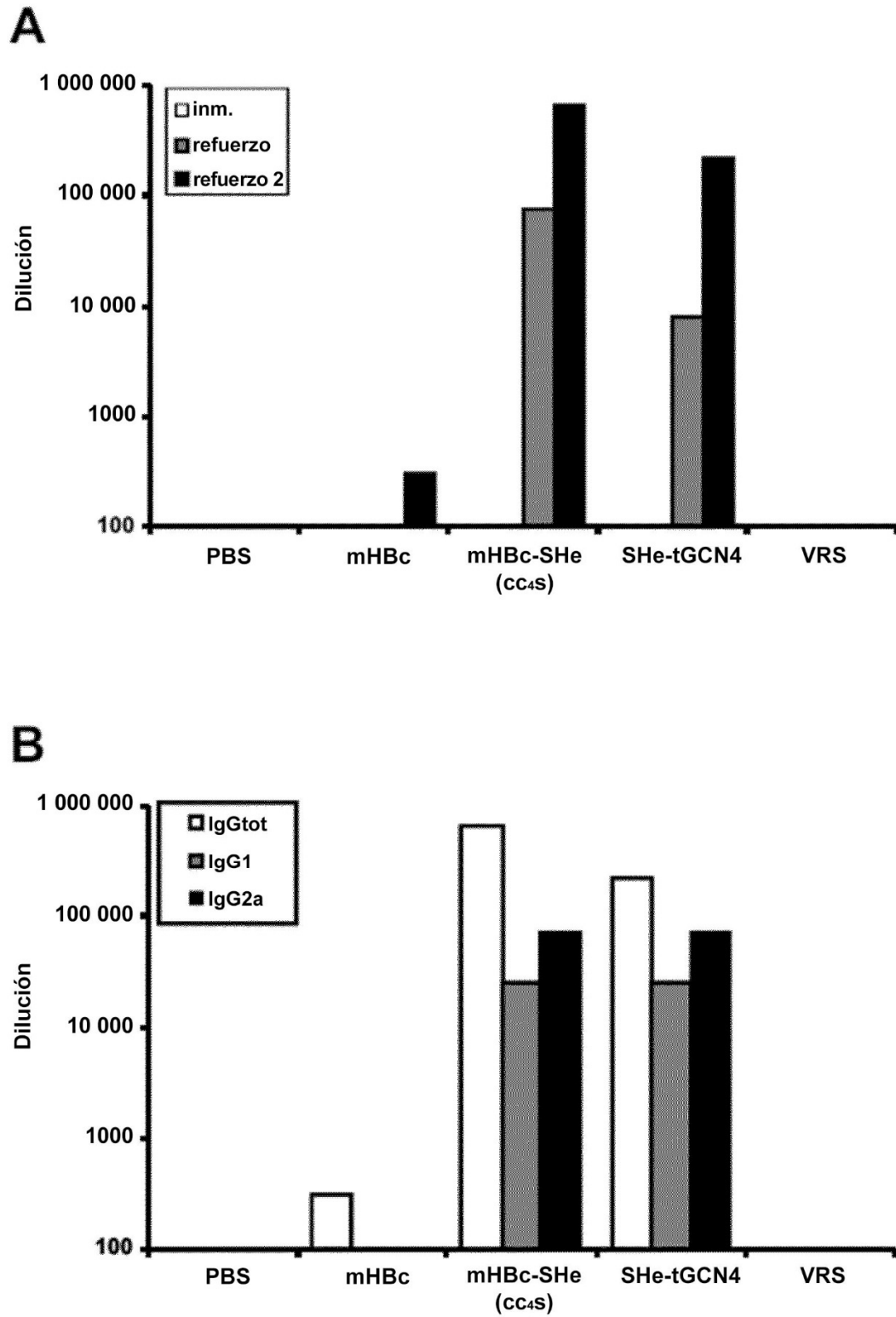
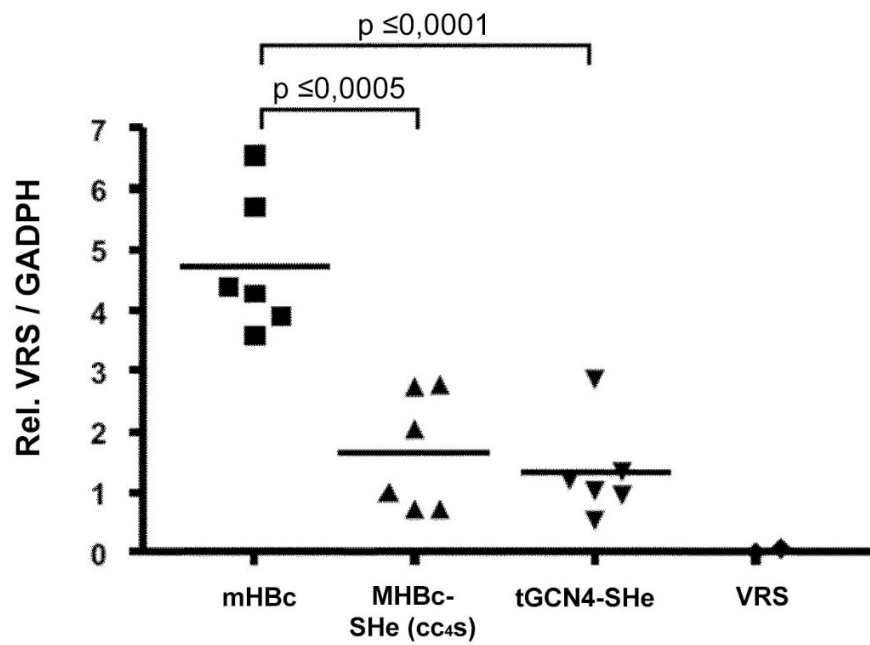


Figura 11

A



B

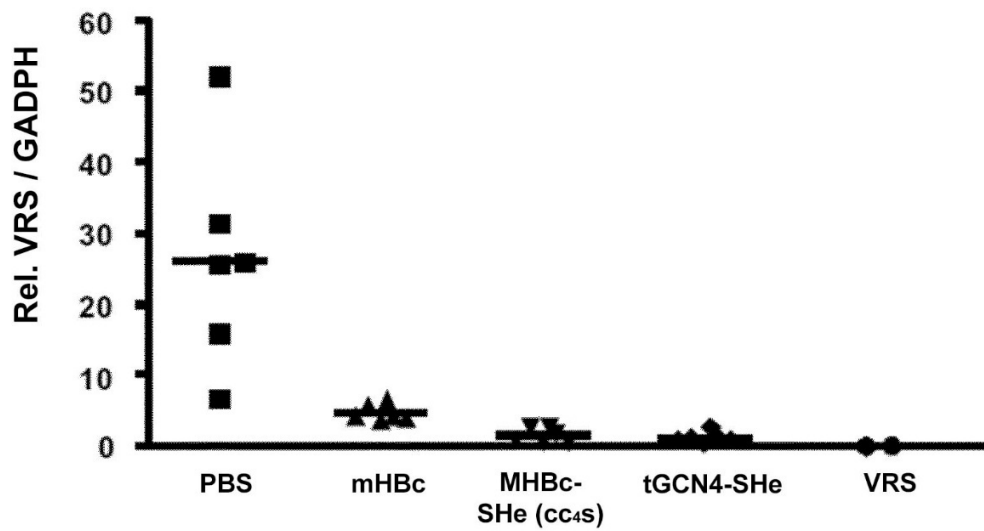


Figura 12

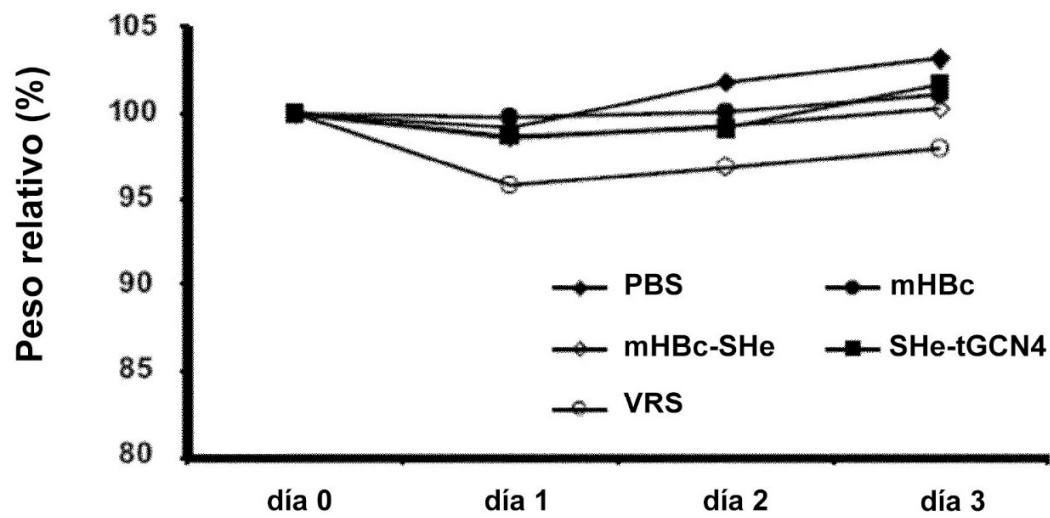


Figura 13

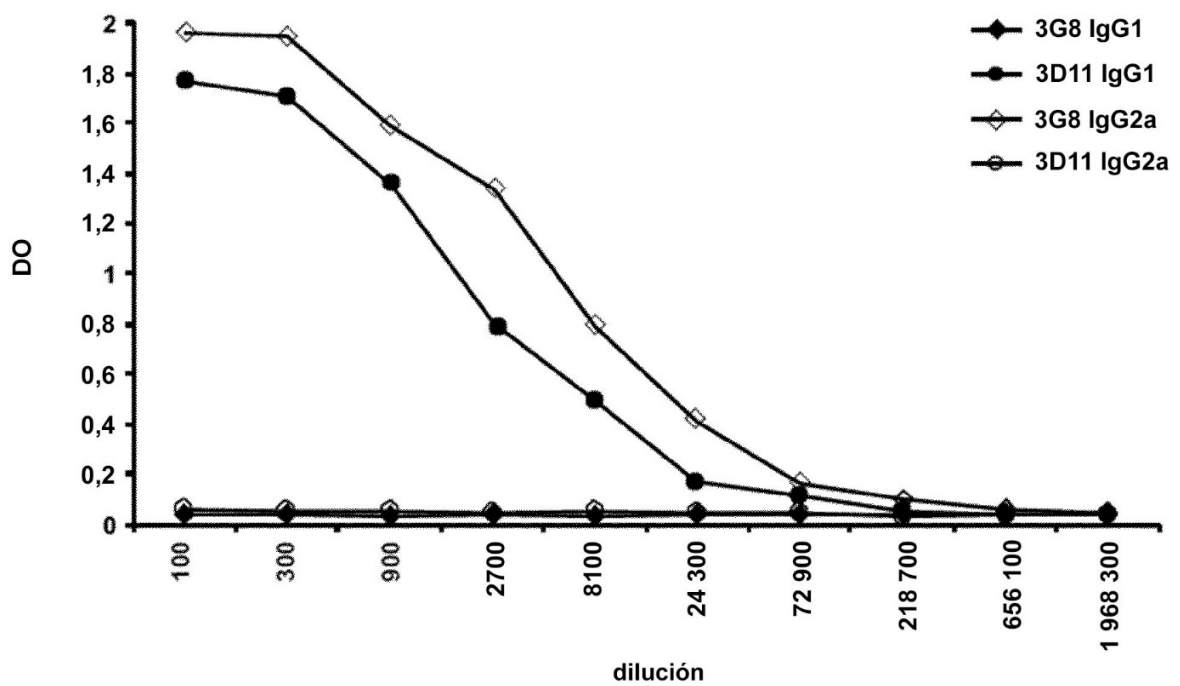


Figura 14

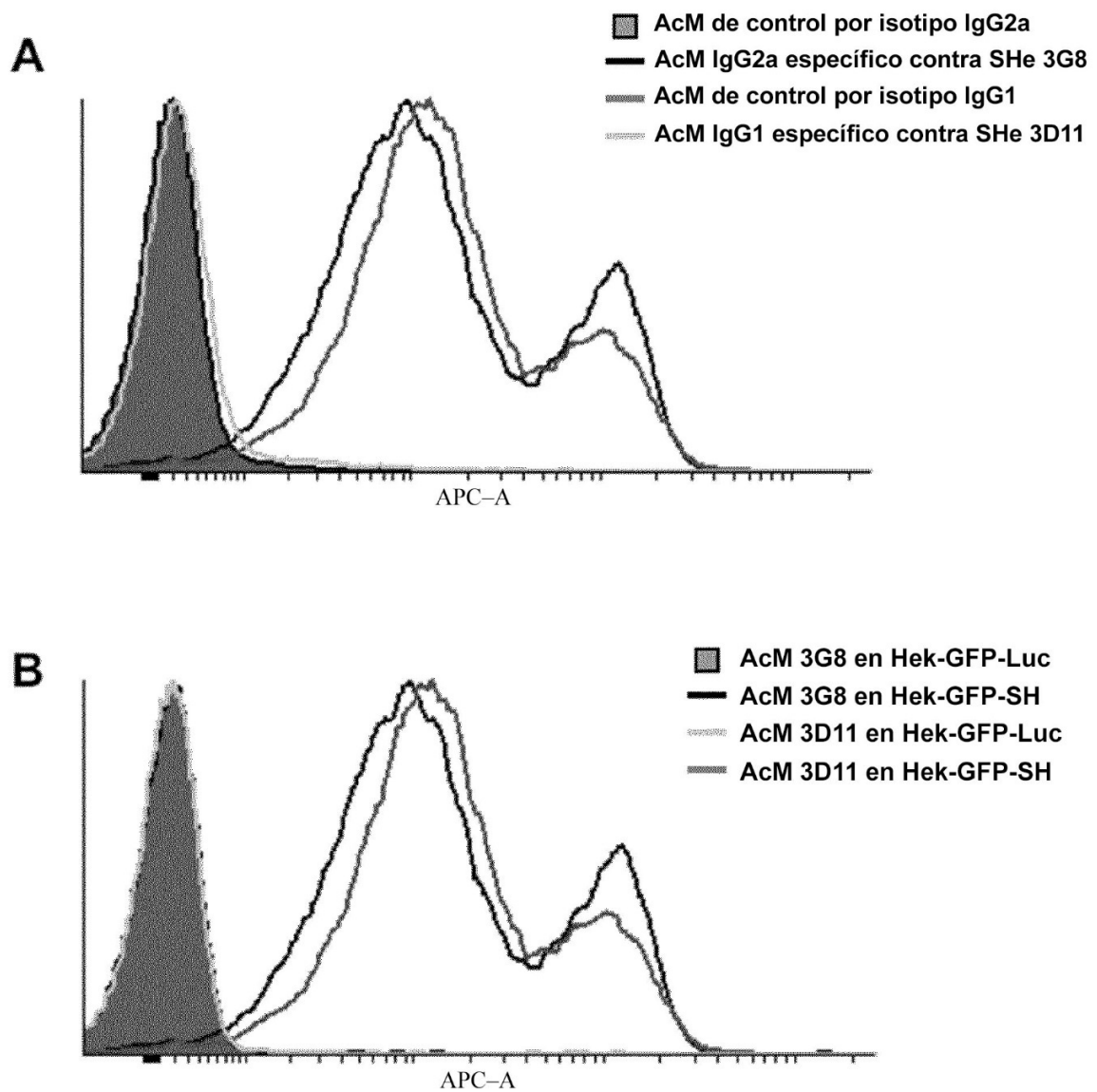


Figura 15

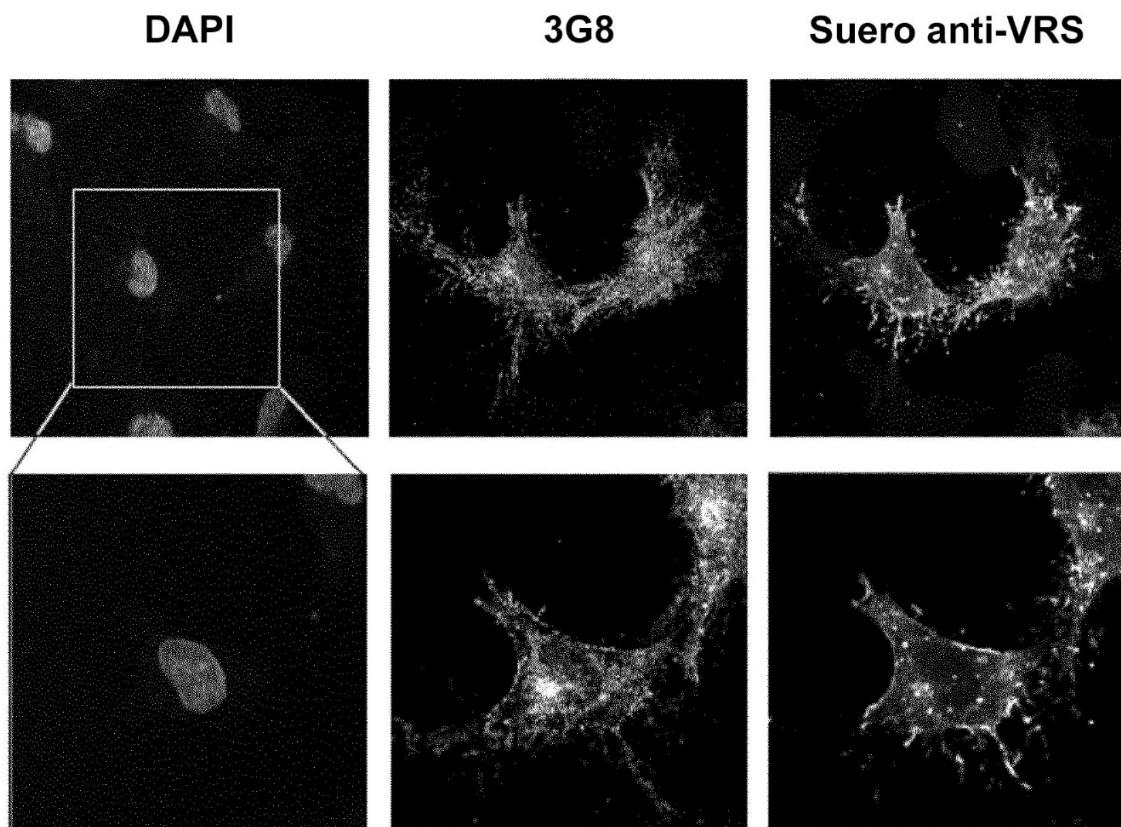


Figura 16

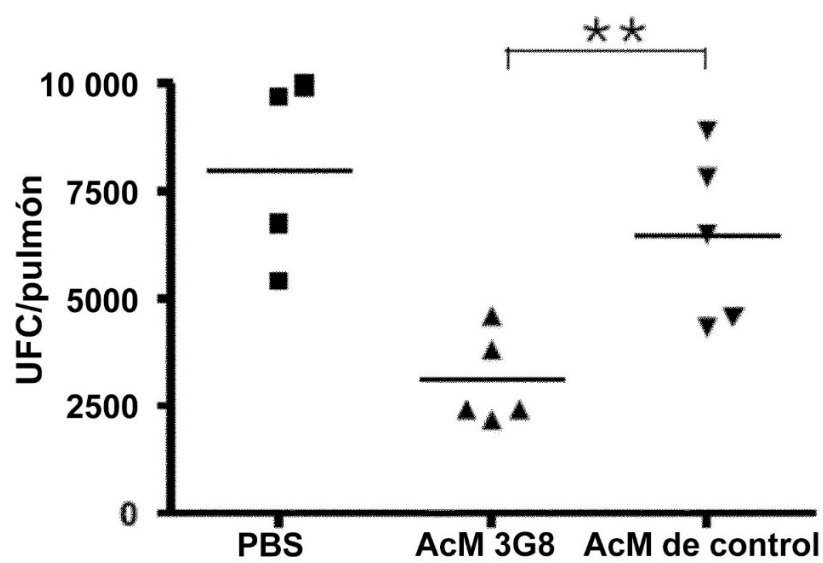
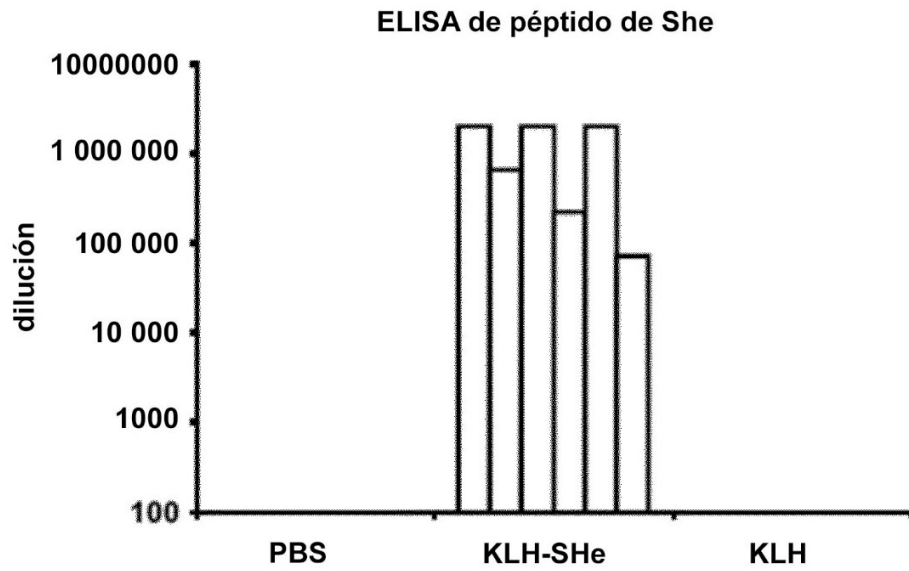
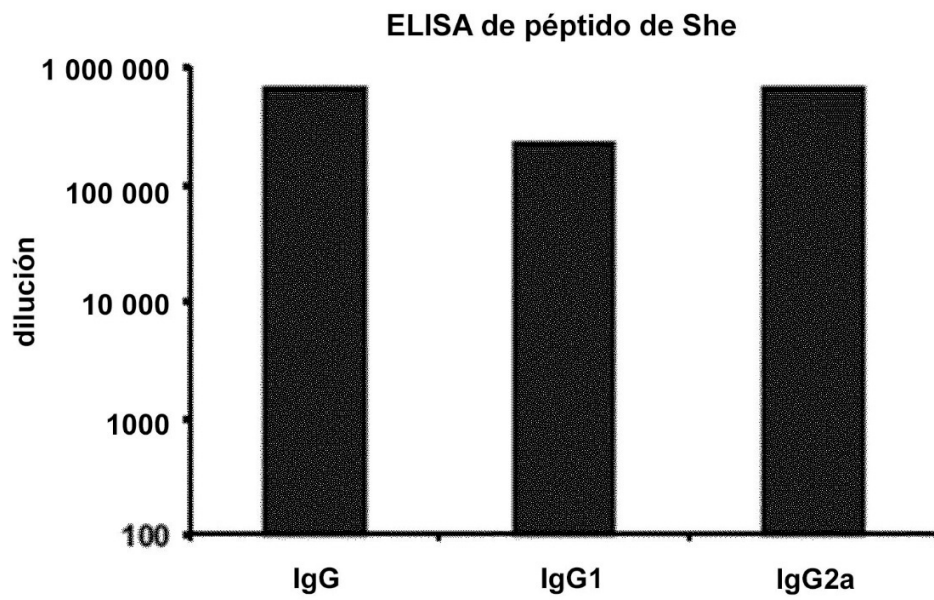


Figura 17

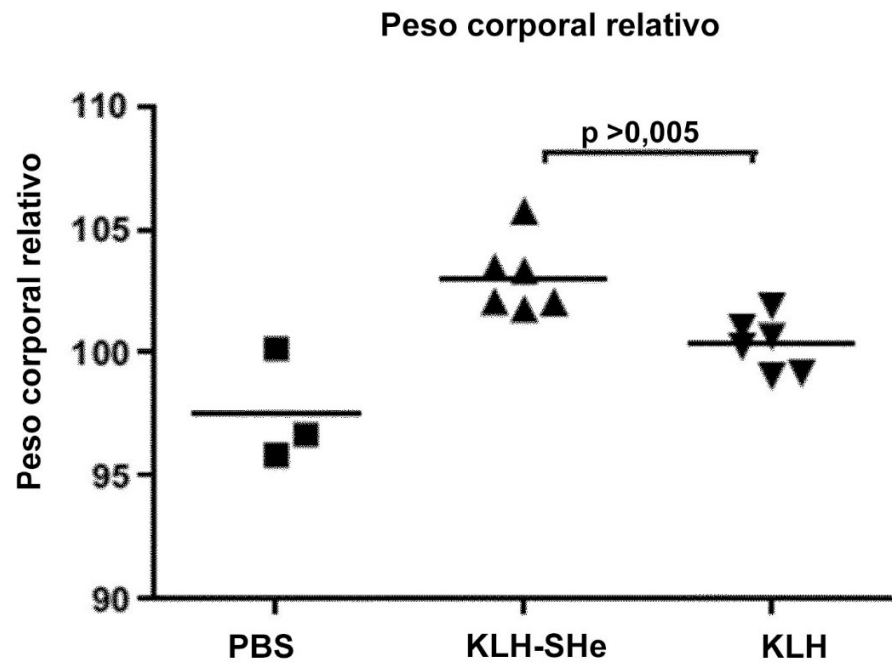
A



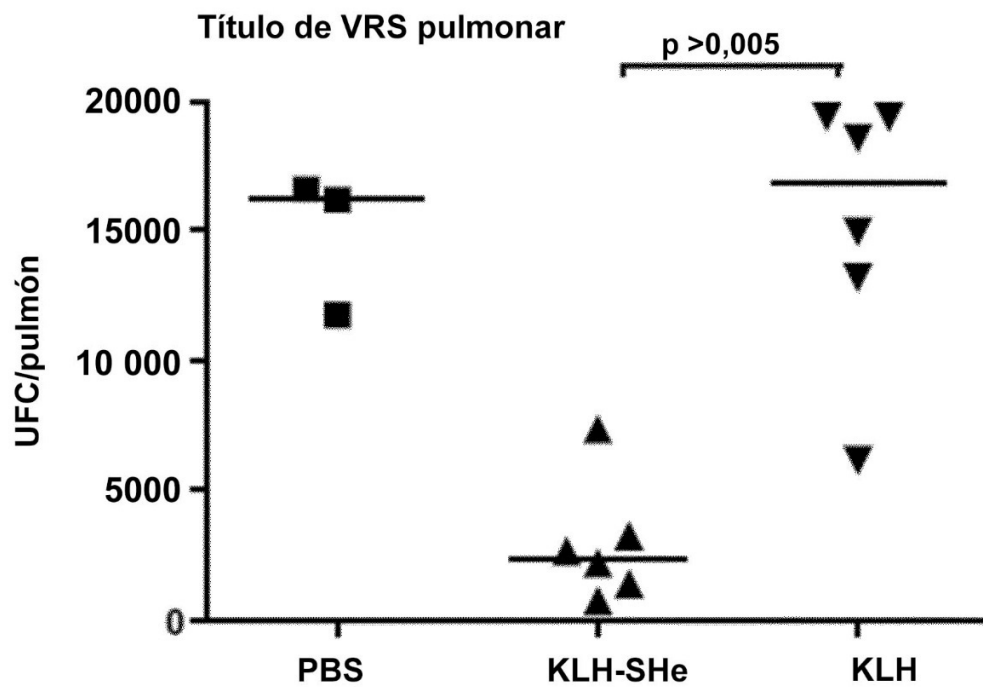
B



C



D



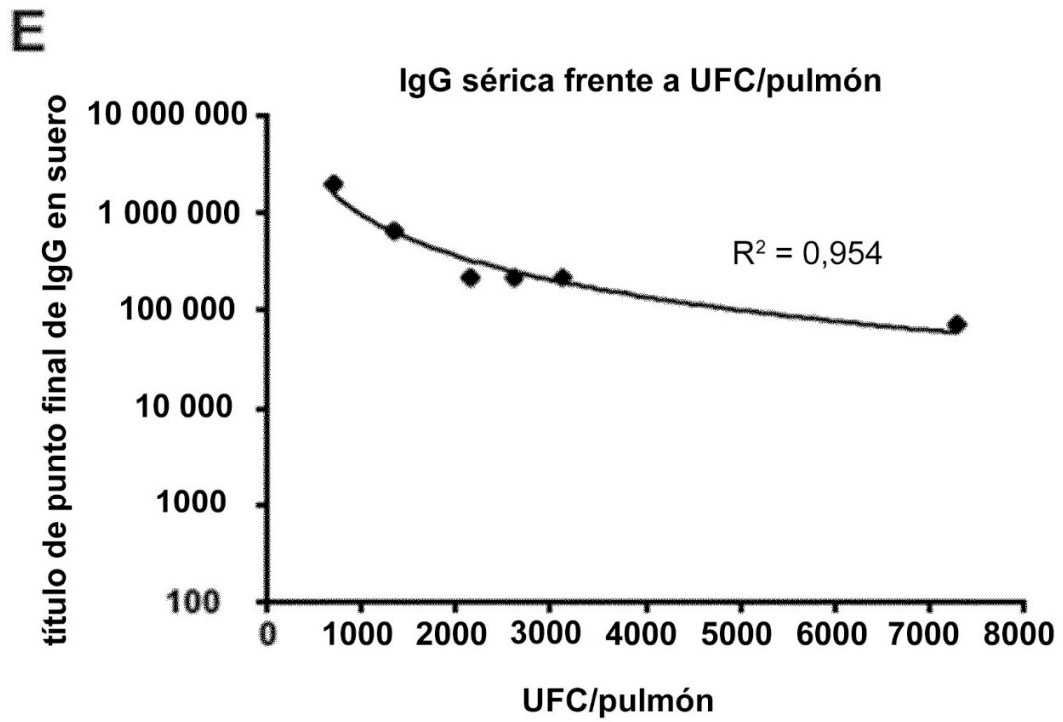
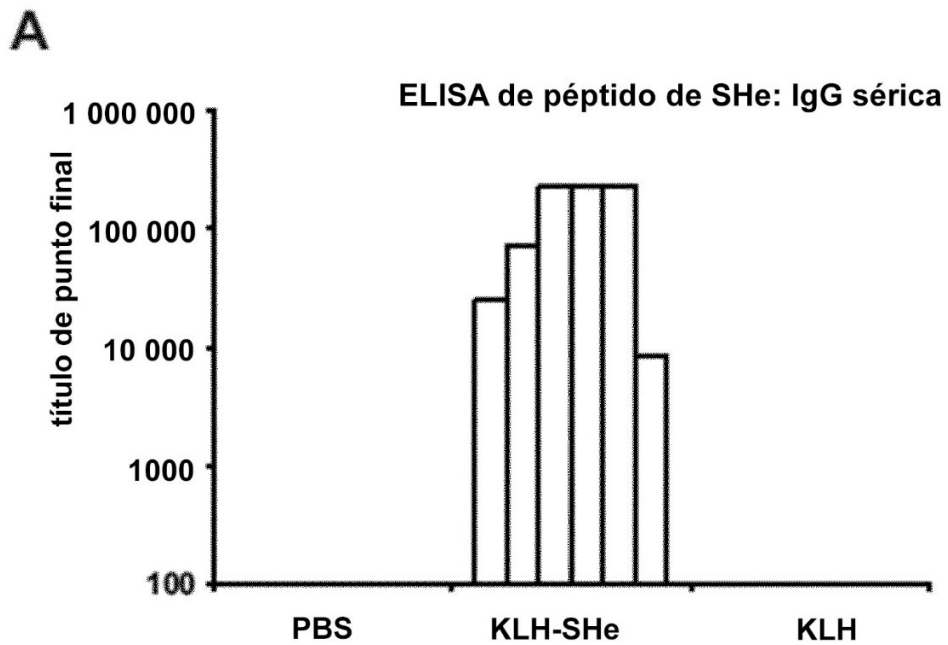
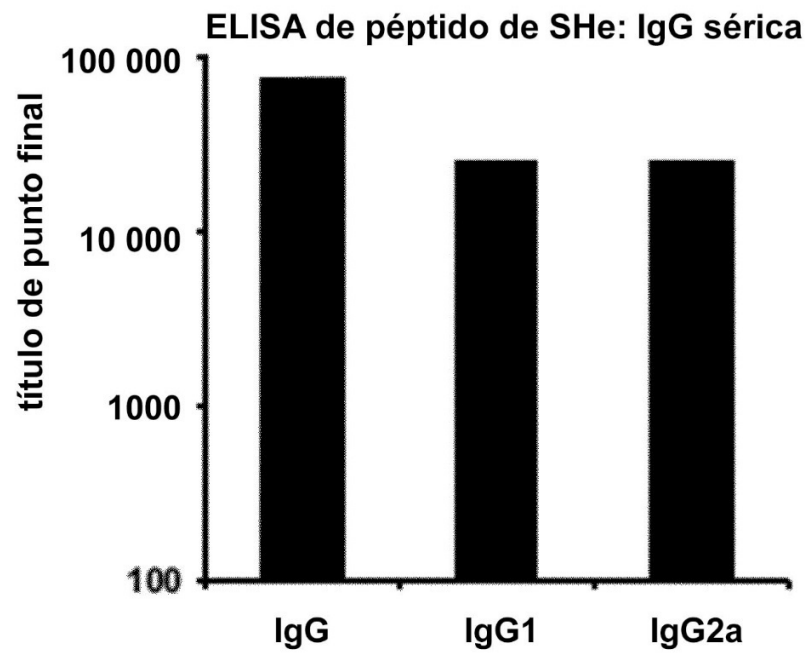


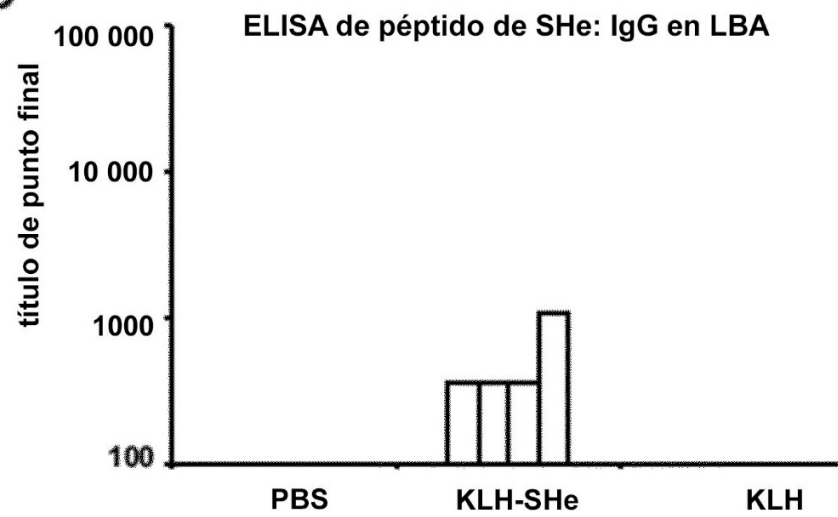
Figura 18



B



C



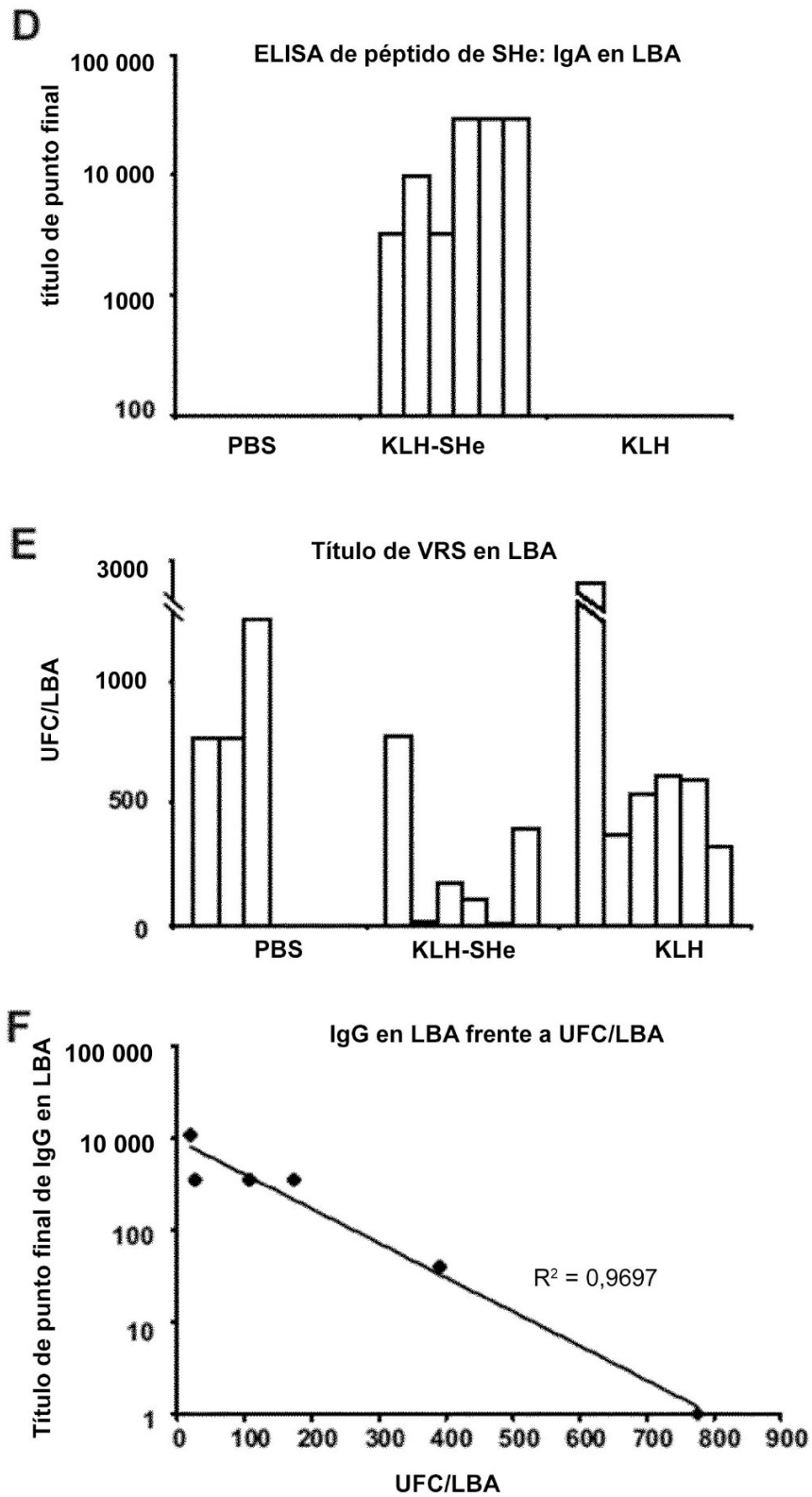
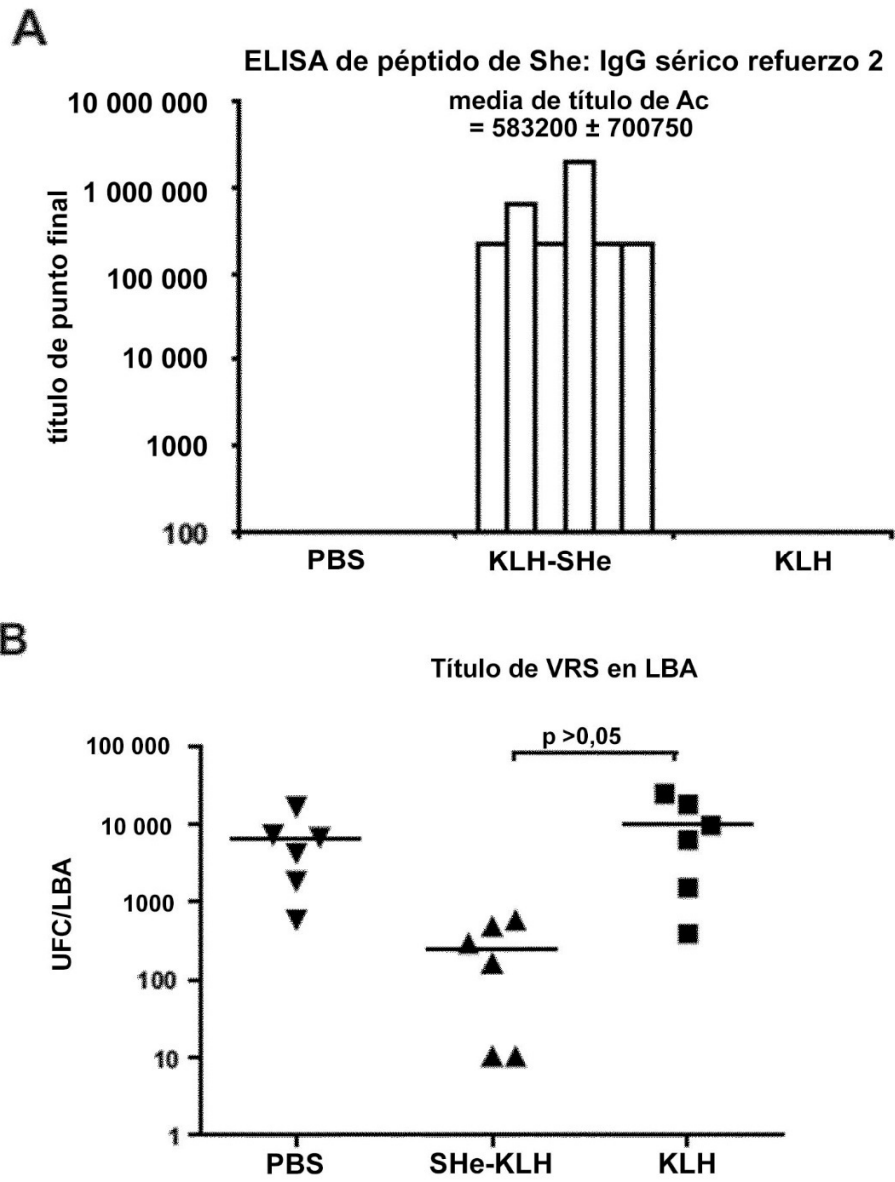


Figura 19



C

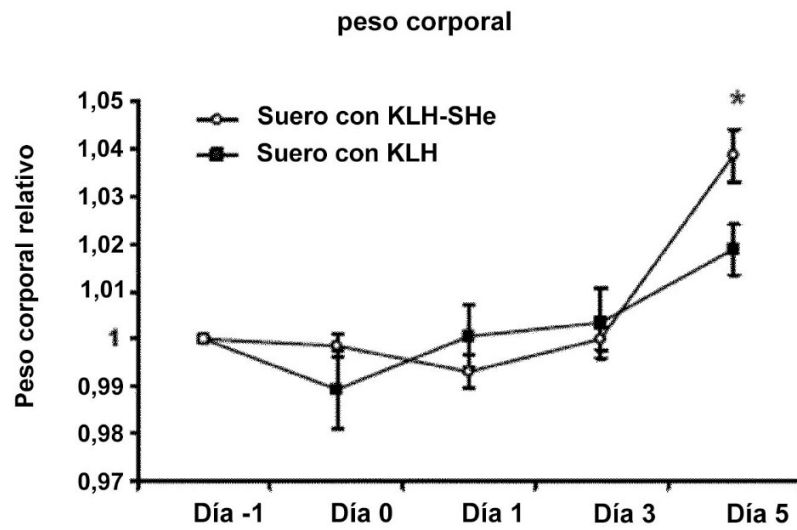


Figura 20

A

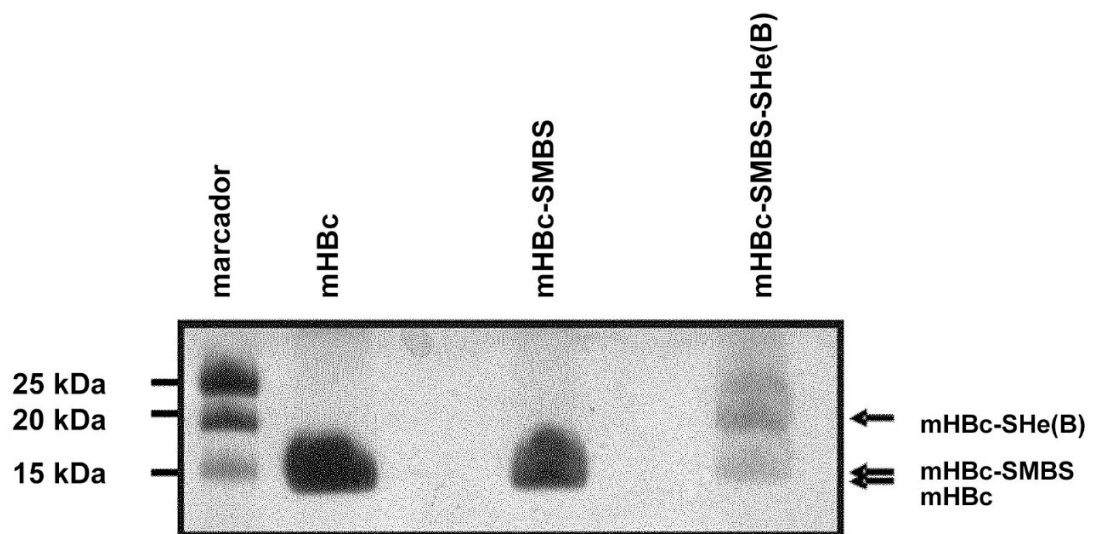


Figura 21

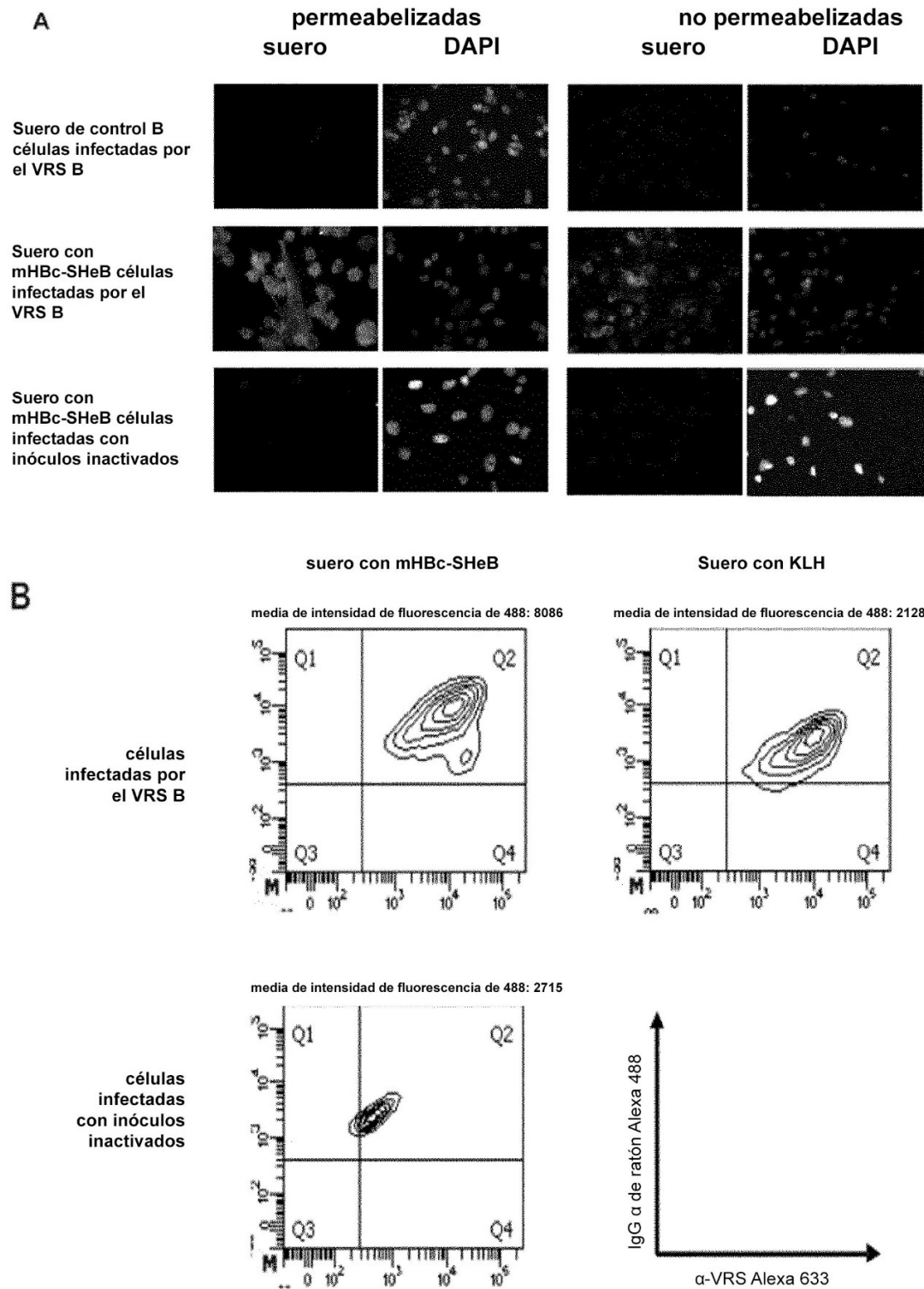
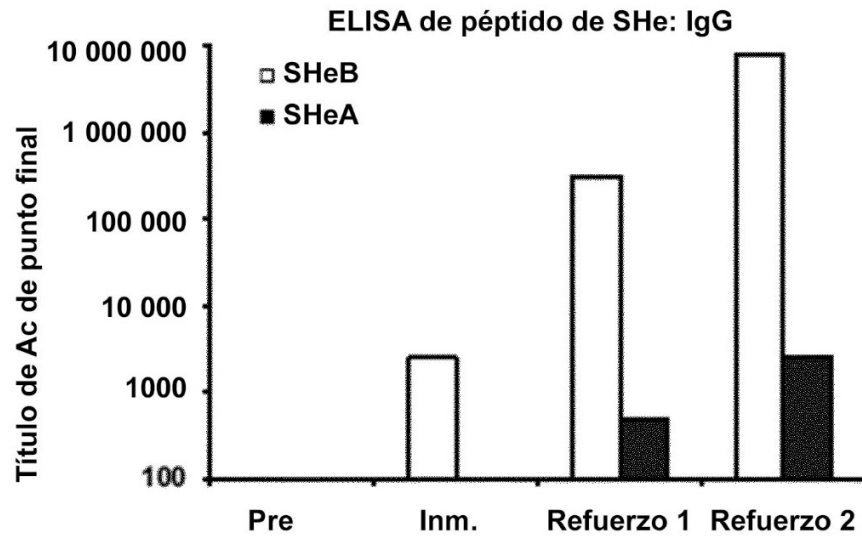
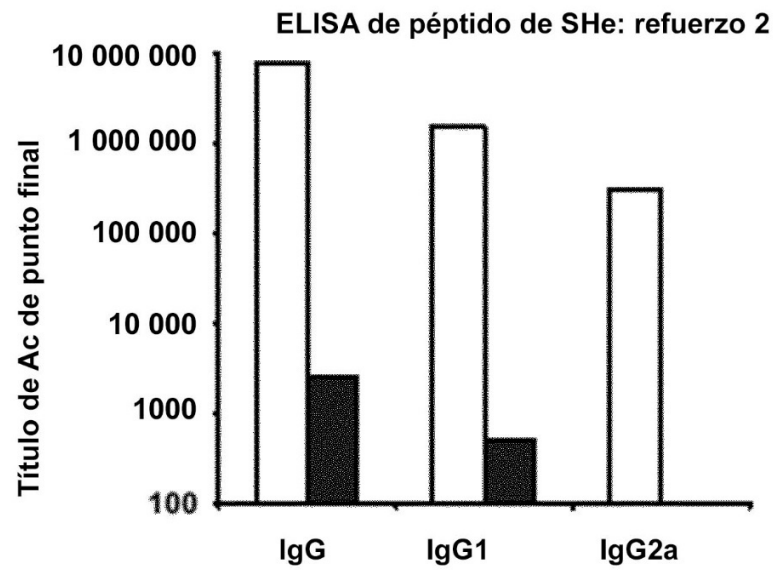


Figura 22

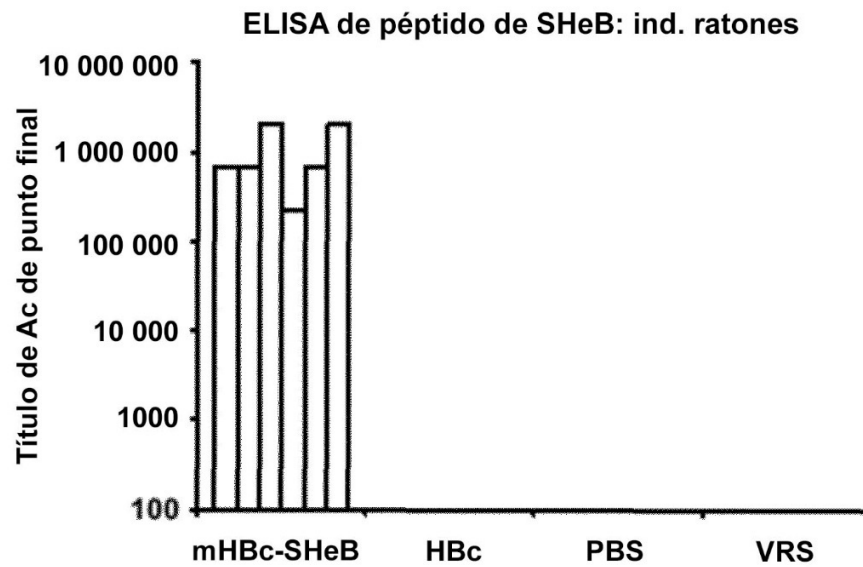
A



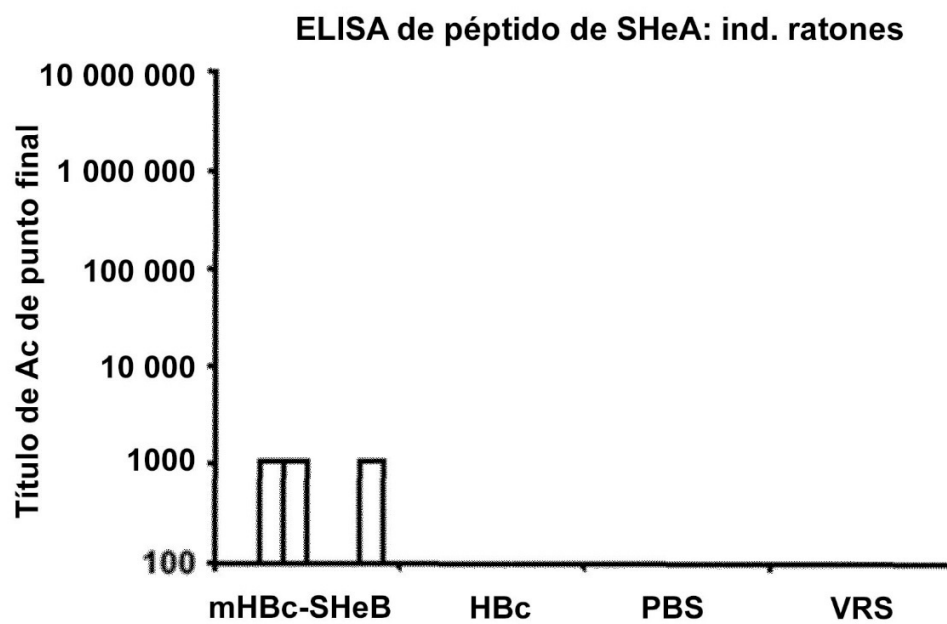
B



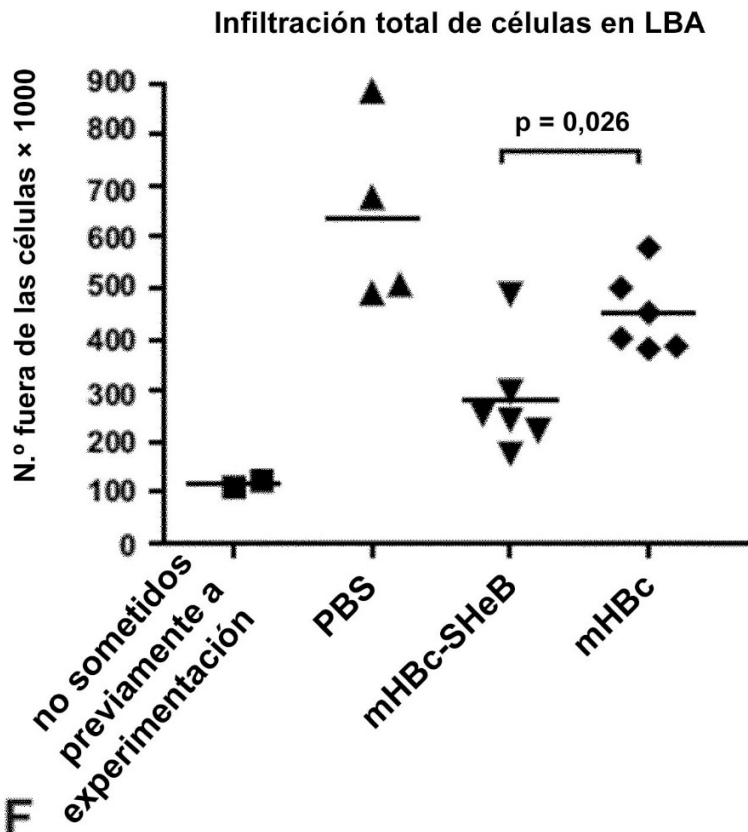
C



D



E



F

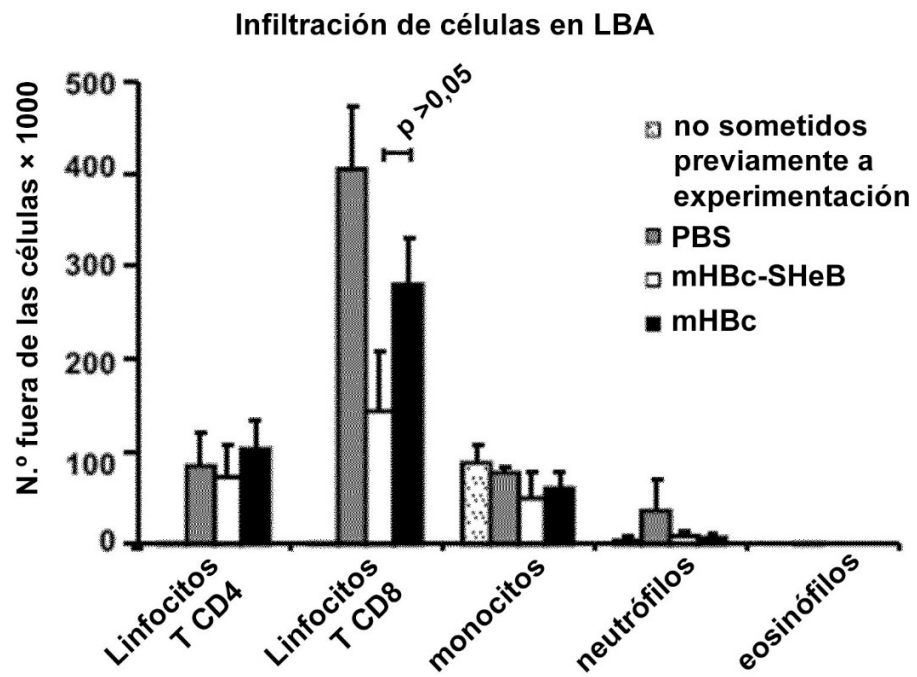


Figura 23

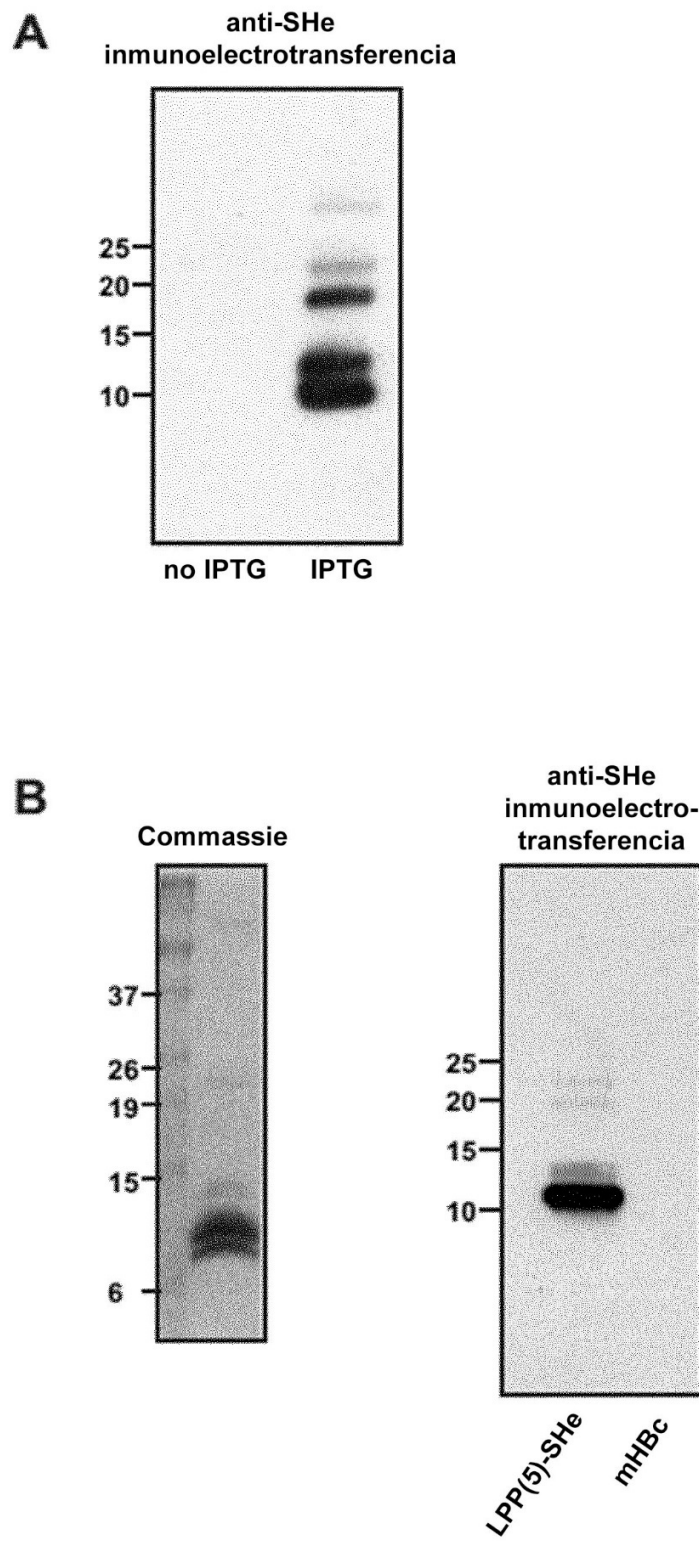


Figura 24

