

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 500**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
C07K 14/715	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C12N 7/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2015 PCT/EP2015/062833**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193143**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015 E 15729781 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3158058**

54 Título: **Proteínas de fusión y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.06.2014 EP 14172950

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

02.01.2020

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)
Simmelweisstrasse 7
82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**JAEGER, SEBASTIAN;
DAUBERT, DANIELA y
GOETZ, KATHRIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 736 500 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

Proteínas de fusión y usos de las mismas

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5 Las proteínas de membrana son el principal grupo de dianas para la terapéutica con anticuerpos. Las proteínas integrales de membrana, tales como los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), canales y transportadores iónicos, están implicadas en diversas funciones biológicas y también en muchas enfermedades. Aproximadamente 40% de todos los fármacos médicos modernos están orientados a GPCRs. Sin embargo, debido a sus dominios hidrófobos, las proteínas de membrana son difíciles de solubilizar y purificar. Muestras proteínicas puras y estables de proteínas de membrana están escasamente disponibles. Por esta razón hay una gran necesidad de proporcionar 10 tecnologías para la presentación eficiente de proteínas de membrana a fin de desarrollar nuevas terapéuticas basadas en anticuerpos.

15 Los retrovirus son partículas envueltas de aproximadamente 100 nm de tamaño (Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV): ~ 120 nm, Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMLV): ~ 90 nm). Los viriones contienen dos moléculas idénticas de RNA monocatenario de 7-10 kb de longitud. La envoltura del virus se adquiere durante el ensamblaje del virus en la membrana plasmática y contiene fosfolípidos y proteínas de la célula hospedadora, pero también cierta cantidad de glicoproteínas virales (en el caso de HIV por ejemplo gp41 y gp120). El papel de estas proteínas de la envoltura viral es identificar y fijarse a sitios receptores en las células diana. Después de la fijación, el virus se fusiona con la membrana de la célula diana, permitiendo que la cápsida y el genoma viral entren e infecten la célula diana/hospedadora. Después de la infección de la célula hospedadora, el virus utiliza su propia transcriptasa 20 inversa para sintetizar DNA a partir de su RNA genómico. La enzima integrasa inserta el DNA en el genoma de las células hospedadoras. Después de ello, la célula hospedadora expresa las proteínas virales requeridas para ensamblaje de nuevas copias del virus.

25 Como ejemplo, el DNA de HIV contiene tres genes principales (gag, pol y env) y 6 genes accesorios (vif, vpr, vpu, tat, rev, nef). Los tres genes principales contienen la información necesaria para fabricar las proteínas estructurales para nuevas partículas víricas. ENV codifica la proteína de la envoltura viral gp160, que es escindida por furina para formar gp120 y gp41. Éstas son transportadas a la membrana plasmática de la célula hospedadora, donde gp41 ancla gp120 a la membrana de la célula infectada. POL codifica las enzimas requeridas para la replicación (transcriptasa inversa) e integración (integrasa) del virus, así como una proteasa viral. Gag es una poliproteína multi-dominio. La poliproteína Gag es escindida por la proteasa viral, separando seis proteínas: la matriz de tres dominios plegados (MA), la cápsida (CA), la nucleocápsida (NC) y tres péptidos más cortos SP1, SP2 y p6. Los genes accesorios codifican proteínas reguladoras que controlan la capacidad de HIV para infectar células, producir nuevas copias del virus (se replican), o 30 causar enfermedad.

35 El ensamblaje del virus ocurre en la membrana plasmática de la célula hospedadora, en la cual se insertaron las proteínas de la envoltura viral. Las proteínas gag, la mayor parte de la cápsida viral (2000-4000 copias por virión), se asocian con la superficie interior de la membrana plasmática. Gag recluta otros componentes esenciales del virión que incluyen las proteínas de replicación virales (expresadas como proteínas de fusión Gag-Pol) y el RNA genómico. El ensamblaje de las proteínas Gag conduce a la gemación del virus, que es inicialmente un virión no infeccioso. Este virión denominado inmaduro contiene principalmente poliproteínas Gag no escindidas. La formación de un virión infeccioso requiere el procesamiento de Gag por la proteasa viral en 5 sitios específicos, conduciendo a un 40 reordenamiento de la organización interior.

45 Las partículas semejantes a virus (VLPs) se asemejan a los virus, pero no son infecciosas dado que no contienen cantidad alguna del material genético viral. La expresión de las proteínas estructurales del virus da como resultado el auto-ensamblaje de las partículas semejantes a virus (VLPs). Existen diferentes estrategias para la generación de VLPs. Proteínas principales de la cápsida pueden producirse en una diversidad de sistemas de cultivo de células que incluyen líneas de células de mamífero, líneas de células de insecto, levaduras, y células vegetales.

Principalmente, la sobre-expresión recombinante de Gag es suficiente para la formación de partículas semejantes a virus. Las proteínas Gag se asocian con la superficie interior de la membrana plasmática, causando la gemación de envolturas vacías en el medio de cultivo de las células. La envoltura vacía está rodeada por la membrana plasmática de la célula hospedadora y contiene diversas proteínas de la célula hospedadora.

50 Las proteínas principales de la cápsida del virus, tales como la proteína Gag de HIV, son herramientas conocidas para la generación de partículas semejantes a virus (VLPs) (Delachambre, 1989, Deml 1997). Tales VLPs pueden utilizarse para la expresión de proteínas heterólogas, en particular proteínas que son difíciles de expresar por otros medios, por ejemplo, proteínas que abrazan la membrana. Véase por ejemplo US 7763258. Sin embargo, estos sistemas se caracterizan por la coexpresión de la proteína de la cápsida viral y la proteína heteróloga que abraza la membrana.

55 Las proteínas principales de la cápsida viral han sido utilizadas también para generar vacunas. Véase por ejemplo EP0449116, WO07/054792, WO2014/128568, WO2008089144 o WO2013068847. En tales enfoques, las proteínas de la cápsida se modificaban para incorporar ciertas proteínas heterólogas que son presentadas al sistema inmune

en dichas proteínas de la cápsida. Asimismo, se utilizaron proteínas de la cubierta de bacteriófagos para generar partículas presentadoras de antígeno derivadas de fago para vacunación (WO06/032674). Sin embargo, tales partículas derivadas de fago se producen en *E. Coli*, y por tanto no están rodeadas por la membrana plasmática de una célula eucariota.

- 5 Partículas semejantes a virus se han generado también utilizando otras proteínas distintas de las proteínas de la cápsida viral para la presentación de péptidos o proteínas en las partículas semejantes a virus. Tales proteínas incluyen neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) (Kaczmarczyk et al. (PNAS) 108, 16998-17003).

Otros sistemas utilizan técnicas de interacción proteína-proteína en las cuales ambas, la proteína de la cápsida y la proteína de interés, están fusionadas a un resto peptídico o proteináceo asociado, que interaccionan uno con otro. Esto conduce a la co-localización de la proteína de la cápsida con la proteína de interés, y por tanto la proteína de interés puede presentarse o visualizarse en una VLP. Véase Mayr & Schenker (presentación en la 8ª PEGS Annual Conference, Boston, abril 30-mayo 3, 2012).

La presente descripción proporciona un método mejorado para la presentación y visualización de proteínas, en particular, proteínas transmembranales, sobre partículas semejantes a virus.

- 15 Es importante que la presente descripción hace uso de proteínas de fusión, en las cuales la proteína que va a ser visualizada está fusionada en el terminal N a la proteína de la cápsida viral. Las proteínas de la cápsida viral están miristoiladas en el terminal N, y por tanto la técnica anterior no utilizaba tales fusiones en el terminal N. En la presente descripción se demuestra que tales proteínas de fusión pueden expresarse con éxito, sin embargo, y la proteína de interés respectiva puede presentarse en partículas semejantes a virus. Un sistema de este tipo tiene numerosas ventajas.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

25 La Figura 1 muestra los resultados de un análisis de Transferencia Western. El panel A muestra los resultados del Experimento A, el panel B muestra los resultados del Experimento B. Para detalles véase el Ejemplo 3. Los sobrenadantes se sondaron con un anticuerpo anti-GAG o un anticuerpo anti-GPCR, como se indica en la Figura. Las pistas del lado derecho en las transferencias presentadas en el panel A comprenden un marcador de tamaño teñido previamente. Lo mismo ocurre para las pistas del ácido izquierdo en las transferencias que se muestran en el panel B.

La Figura 2 muestra una SDS-PAGE de las VLPs del experimento B.

30 La Figura 3 muestra un experimento ELISA con tres proteínas de fusión GPCR-GAG diferentes. Se dan detalles en el Ejemplo 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida de un retrovirus, en donde dicha proteína principal de la cápsida del retrovirus es una proteína Gag y en donde dicha proteína de membrana no es LAMP-1.

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida de un retrovirus, en donde dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus es una proteína Gag y en donde dicha proteína de membrana no es LAMP-1, y en donde dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus se selecciona de la proteína Gag del virus de la leucemia murina de Moloney y la proteína Gag del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

40 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida de un retrovirus, en donde dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus es una proteína Gag y en donde dicha proteína de membrana no es LAMP-1, en donde dicha proteína de fusión comprende un péptido enlazador entre dicha proteína de membrana y dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus.

45 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida de un virus.

El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias nucleotídicas de al menos dos genes o dos moléculas de ácido nucleico que no existen juntas naturalmente.

50 El término "proteína de membrana" se refiere a una proteína que está unida a o asociada con una membrana de una célula o un orgánulo. Si una proteína de membrana abraza la membrana celular, entonces puede hacerse referencia también a dicha proteína como "proteína integral de membrana" o "proteína transmembranal". Por esta razón, en ciertas realizaciones de la presente descripción, la proteína de membrana que está fusionada en el terminal N a la

proteína principal de la cápsida de un virus es una proteína integral de membrana. En otras realizaciones de la presente descripción, la proteína de membrana que está fusionada en el terminal N a la proteína principal de la cápsida del virus es una proteína transmembranal.

5 El término "fusionada en el terminal N" se refiere a una fusión genética de un primer y un segundo polipéptido/proteína, en donde el primer polipéptido/proteína forma la porción N-terminal de la proteína de fusión. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la proteína de membrana forma la porción N-terminal de la proteína de fusión. "GPCR" o "receptor acoplado a proteína G" son proteínas de membrana. El término se refiere a una gran familia de receptores de la superficie celular con una colección de ligandos y diversas acciones biológicas. La importancia de los GPCRs en la función celular, su diversidad, y su accesibilidad a agentes exógenos hacen de los mismos un foco importante de investigación en procesos de enfermedad y descubrimiento de fármacos. Los sucesos de activación de GPCR son comunicados a caminos de señalización celular por proteínas I de fijación de GTP (proteínas G) asociadas con el dominio intracelular del receptor. Los GPCRs constituyen hoy en día el mayor grupo de dianas de fármacos, poniendo de relieve su importancia en la investigación biológica y en los mecanismos de las enfermedades. Sin embargo, los GPCRs son estructuralmente complejos, abrazando siete veces la membrana celular. La eliminación de la membrana celular destruye usualmente la estructura natural del receptor en la cual se mantiene el mismo por el ambiente de la bicapa lipídica. Los GPCRs son por tanto extremadamente difíciles de purificar y manipular experimentalmente, y su estudio está basado en células enteras o membranas celulares aisladas. GPCRs incluyen, sin limitación, receptores de serotonina y receptores olfativos, receptores de hormonas glicoproteínicas, receptores de quimiocinas, receptores de adenosina, receptores de aminas biógenas, receptores de melanocortina, receptores de neuropéptidos, gestores quimiotácticos, receptores de somatostatina, receptores de opioides, receptores de melatonina, receptores de calcitonina, receptores PTH/PTHrP, receptores de glucagón, receptores de secretina, receptores de latrotoxina, receptores de glutamato metabotrópicos, receptores de calcio, receptores GABA-B, receptores de feromonas, receptores de histamina, receptores activados por proteasas, rodopsinas y otros receptores de siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G. Los GPCRs incluyen también estos receptores GPCR asociados unos a otros como dímeros homómeros o heterómeros o como oligómeros de orden superior.

GPCRs ilustrativos incluyen: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT6, 5-HT7, MI, M2, M3, M4, M5, AI, A2A, A2B, A3, a1A, a1B, a1D, a2A, a2B, a2C, b1, b2, b3, ATI, AT2, BBI, BB2, BB3, BI, B2, CBI, CB2, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCRI, CX3CR1, XCR1, CCK1, CCK2, DI, D2, D3, D4, D5, ETA, ETB, GAL1, GAL2, GAL3, motilina, grelina, HI, H2, H3, H4, CysLTI, CysLT2, BLT1, BLT2, OXE, ALX, LPAI, LPA2, LPA3, SIPI, S1P2, S1P3, S1P4, S1P5, MCHI, MCH2, MCI, MC2, MC3, MC4, MC5, NMUI, NMU2, Y1, Y2, Y4, Y5, NTS1, NTS2, d, k, m, NOP, OXI, OX2, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, PAF, PKRI, PKR2, PRRP, DP, EPI, EP2, EP3, EP4, FP, IPI, TP, PAR1, PAR2, PAR3, PAR4, sst2, sst5, sst3, sst1, sst4, NK1, NK2, NK3, TRH, UT, OT, VIA, V2, VIB, APJ, FFA1, FFA2, FFA3, GPBA, TSH, LH, FSH, GnRH, KiSSI, MT1, MT2, NPFF1, NPFF2, NPS, NPBWI, NPBW2, P2Y12, P2Y13, QRFP, RXFP1, RXFP2, RXFP3, RXFP4, TAI, TA3, TA4 y TA5.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, la proteína de membrana que está fusionada en el terminal N a la proteína principal de la cápsida del virus es un GPCR. En otras realizaciones de la presente descripción, dicho GPCR se selecciona de la lista de CCR1, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR7, motilina, grelina, PAR1 y PAR2. En otras realizaciones de la presente descripción, dicho GPCR es CXCR2.

40 Los "canales iónicos" son proteínas de membrana. El término se refiere a una proteína que atraviesa la bicapa lipídica de una célula, y que, de una manera regulada, transporta solutos y/o agua a través de las membranas celulares. Los canales son responsables de la generación y propagación de impulsos eléctricos en tejidos excitables en el cerebro, corazón, y músculos y para el ajuste del potencial de membrana de células excitables y no excitables. Canales iónicos ilustrativos incluyen canales de sodio, canales de potasio, y canales de calcio, así como canales iónicos con compuertas unidas a ligandos tales como canales de serotonina, glutamato, y ácido γ -aminobutírico (GABA).

En ciertas realizaciones de la presente descripción, la proteína de membrana que está fusionada en el terminal N a la proteína principal de la cápsida viral es un canal iónico.

50 El término "proteína principal de la cápsida" o "proteína de la cápsida" se refiere a una proteína viral o un equivalente funcional de la misma, que dirige el ensamblaje y la liberación de las partículas de virus por la célula hospedadora infectada. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la proteína principal de la cápsida o proteína de la cápsida es una proteína de la cápsida retroviral. En una realización preferida, la proteína principal de la cápsida o proteína de la cápsida es una proteína Gag o un equivalente funcional de la misma.

La proteína la cápsida puede ser una proteína Gag. El término "proteína Gag", "proteína GAG" o "antígeno específico de grupo" se refiere a una familia de glicoproteínas que forman la cápsida de ciertos virus.

55 Dos proteínas Gag específicas que pueden utilizarse conforme a la presente descripción incluyen:

La proteína Gag del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) - (UniPort: P03332):

MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGT FN
 RDLITQVKIKV FSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLP
 LEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDRPPPSDRDG
 NGGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSD
 LYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKAV
 RGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLA
 KVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLRL
 EDLKNKTLGLDVLREAEIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRRH
 REMSKLLATVVSQGQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGP
 RPQTSLTLLDD (SEQ ID NO.: 1)

La proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia humana (HIVB1) - (UniPort: P03347):

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYK LKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQ
 ILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQAAA
 DTGHSSQVSQNYPIVQNIQGMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALSEGA
 TPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIA
 GTTSTLQEQIGWMTNPPPIVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDR
 FYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNaNPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPG
 HKARVLAEAMSQVTNTATIMMQRGNFRNQRKMVKFCNGKEGHTARNCRAPRKKGCW
 KCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQSRPEPTAPPFLQSRPEPTAPPE
 EFSRSGVETTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ (SEQ ID NO.: 2)

- 5 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida viral, en donde dicha proteína principal de la cápsida viral es una proteína GAG. En ciertas realizaciones, dicha proteína Gag es una proteína Gag del virus de la leucemia murina de Moloney. En ciertas realizaciones, dicha proteína Gag es una proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia humana.
- 10 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida viral. En otras realizaciones, la proteína de fusión comprende un péptido enlazador entre dicha proteína de membrana y dicha proteína principal de la cápsida viral.
- 15 En ciertas realizaciones, la proteína de fusión de la presente descripción es capaz de incorporarse o encapsularse en partículas semejantes a virus. En otras realizaciones, la proteína de fusión de la presente descripción está incorporada o encapsulada en partículas semejantes a virus.
- En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de la presente descripción.
- 20 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión de la presente descripción.
- 25 El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al cual se ha unido la misma. Vectores preferidos son aquéllos que son capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los cuales están enlazados. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un bucle de DNA circular bicatenario al cual pueden estar ligados segmentos de DNA adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden estar ligados segmentos de DNA adicionales al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se han introducido (v.g., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora después de introducción en la célula hospedadora, y replicarse por ello junto con el genoma del hospedador. Los vectores pueden ser compatibles con células procariontas o eucariotas. Los vectores procariontas incluyen típicamente un replicón procarionta que puede incluir un promotor procarionta capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) del péptido en una célula hospedadora bacteriana, tal como Escherichia coli transformada con él. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de DNA que permite que
- 30

ocurra la fijación de RNA-polimerasa y la transcripción. Las secuencias promotoras compatibles con hospedadores bacterianos se proporcionan típicamente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de DNA. Los vectores preferidos son vectores de mamífero. Otros vectores preferidos son vectores de mamífero que comprenden un promotor de CMV.

5 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende las moléculas de ácido nucleico o el vector que codifica las proteínas de fusión de la presente descripción. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero. En otras realizaciones de la presente descripción, la célula hospedadora es una célula HKB11 o una célula HEK. En otras realizaciones adicionales de la presente descripción, la proteína de fusión expresada en dicha célula hospedadora está bajo el control de un promotor CMV.

10 El término "célula hospedadora recombinante" o "célula hospedadora" se refiere a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que tales términos tienen por objeto referirse no sólo a la célula objeto particular sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula originaria, pero se incluye todavía dentro del alcance del término "célula hospedadora" como se utiliza en esta memoria. Células hospedadoras típicas son células hospedadoras eucariotas, tales como células hospedadoras de mamífero. Células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen células de levadura y de mamífero que incluyen murinos y roedores, preferiblemente células de vertebrado tales como una línea de células de ratón, rata, mono o humano, por ejemplo, células HKB11, células PER.C6, células HEK o células CHO.

20 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a una partícula semejante a virus que comprende una proteína de fusión de la presente descripción. En otras realizaciones, la presente descripción se refiere a una partícula semejante a virus que comprende una proteína de fusión, en donde dicha proteína de fusión se visualiza en la superficie de dicha partícula semejante a virus.

25 El término "partícula semejante a virus" o "VLP" se refiere a una estructura que se asemeja a una partícula de retrovirus o una partícula semejante a retrovirus con una envoltura compuesta de una bicapa lipídica y proteínas de membrana. Típicamente, la envoltura de la partícula semejante a virus contiene membrana plasmática y proteínas de membrana obtenidas de la célula hospedadora eucariota. En ciertas realizaciones de la presente descripción, las partículas semejantes a virus son no replicativas o no infecciosas, preferiblemente no replicativas y no infecciosas. El término "no replicativo", como se utiliza en esta memoria, se refiere al hecho de ser incapaces de replicar el genoma comprendido por la VLP. El término "no infeccioso", como se utiliza en esta memoria se refiere al hecho de ser incapaces de entrar en la célula hospedadora. Preferiblemente, una partícula semejante a virus conforme a la descripción es no replicativa y/o no infecciosa, dado que carece de la totalidad o una parte del genoma viral o la función genómica. Típicamente, una partícula semejante a virus carece de la totalidad o parte de los componentes replicativos e infecciosos del genoma viral. Una partícula semejante a virus conforme a la descripción puede contener ácido nucleico distinto de su genoma. Una realización típica y preferida de una partícula semejante a virus conforme a la presente descripción es una cápsida viral tal como la cápsida viral del virus correspondiente recubierta con una membrana lipídica conocida como la envoltura viral. Los términos "cápsida viral" o "cápsida", se refieren a un ensamblaje macromolecular compuesto de subunidades proteínicas virales. Típicamente, existen 60, 120, 180, 240, 300, 360 e incluso más de 360 subunidades proteínicas virales. Típica y preferiblemente, las interacciones de estas subunidades conducen a la formación de una cápsida viral o una estructura semejante a cápsida viral con una organización repetitiva inherente, en donde dicha estructura es, típicamente, esférica. Por ejemplo, las cápsidas de los retrovirus tienen forma esférica.

45 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a una partícula semejante a virus que comprende una proteína de fusión de la presente descripción, en donde la partícula semejante a virus se produjo a partir de una célula hospedadora eucariota.

En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a un método para la generación de partículas semejantes a virus que comprenden una proteína de fusión de la presente descripción. En otra realización, la presente descripción se refiere a un método para la generación de partículas semejantes a virus, comprendiendo dicho método los pasos:

(a) proporcionar un vector que codifica una proteína de fusión de la presente descripción,

50 (b) transfectar una célula hospedadora eucariota con un vector del paso (a)

(c) purificar las VLPs a partir del sobrenadante.

Las proteínas de fusión y las partículas semejantes a virus de la presente descripción tienen numerosos usos. Por ejemplo, las VLPs pueden utilizarse para visualizar la proteína de fusión respectiva. Un sistema de visualización de este tipo puede utilizarse, por ejemplo, para clasificación o lavado en batea de bibliotecas de anticuerpos. Esto puede conducir a la identificación de anticuerpos que no pueden generarse por otros medios debido a la ausencia de material antigénico apropiado.

En otras realizaciones, la presente descripción se refiere por tanto al uso de las proteínas de fusión o las VLPs de la presente descripción para la selección de un resto, tal como un anticuerpo, que es reactivo con la parte GPCR o la parte de canal iónico de la proteína de fusión de la presente descripción.

5 En otras realizaciones, la presente descripción proporciona un método para identificar un resto de fijación que se fija a una proteína de membrana, comprendiendo dicho método los pasos:

- (a) proporcionar una proteína de fusión de la presente descripción,
- (b) generar VLPs que comprenden la proteína de fusión del paso (a),
- (c) poner en contacto las VLPs del paso (b) con una biblioteca de anticuerpos,
- (d) lavar las VLPs para eliminar aquellos anticuerpos que no se fijaban a la VLP, y

10 (e) seleccionar un anticuerpo que es reactivo con la parte de proteína de membrana de dicha proteína de fusión.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de proteínas Gag y proteínas de membrana

15 En primer lugar, se seleccionaron dos proteínas Gag ilustrativas para la prueba de experimentos conceptuales. Las proteínas Gag seleccionadas son la proteína Gag del virus de la leucemia murina de Moloney (UniPort: P03332; SEQ ID NO.: 1) y la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia humana (UniPort: P03347; SEQ ID NO.: 2).

Como proteínas integrales de membrana ilustrativas se seleccionaron tres GPCRs: GPCR 1, GPCR 2 y GPCR 3. La GPCR 1 es CXCR2 (UniPort: P03347; SEQ ID NO.: 3):

```
MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPCEPESLEINKYFWIIYALVF
LLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFLC
KVVSLLEKVNFSYGILLACISVDRYLAIVHATRTLQKRYLVKFCLSIWGLSLLLALPVL
LFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIMLFCYGFRTLRTLFK
AHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPLYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDAT
EILGILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
(SEQ ID NO.: 3).
```

20 Ejemplo 2: Generación de constructos y expresión de proteínas

Todos los experimentos de clonación se realizaron utilizando tecnologías estándar. Las proteínas se clonaron en vectores pMAX para la expresión en células de mamífero. La expresión en estos vectores se encuentra bajo control del promotor CMV. Los constructos que se generaron producían, o bien:

- (a) la proteína GAG,
- 25 (b) la proteína GPCR, o

una proteína de fusión, en la cual la proteína GPCR está fusionada en el terminal N a la proteína GAG.

30 La expresión de las proteínas y la producción de las VLPs se realizó en condiciones estándar en cultivos de suspensión. Las células hospedadoras utilizadas en los presentes experimentos son células HKB 11 (ATCC; CRL-12568) y células HEK (Life Technologies). En una serie de experimentos (Experimento A) las células hospedadoras se transfectaron con los dos vectores siguientes: un vector que expresaba Gag y un vector que expresaba el GPCR. En otra serie de experimentos (Experimento B) las células hospedadoras se transfectaron también con dos vectores. Sin embargo, un vector expresaba Gag y el otro vector expresaba la proteína de fusión GPCR-GAG.

Ejemplo 3: Purificación de VLPs y análisis

35 Tres días después de la transfección, los sobrenadantes que contenían las VLPs se cosecharon y se purificaron utilizando procedimientos estándar (que incluían precipitación y cromatografía de intercambio iónico). Las proteínas aisladas se sometieron luego a análisis de Transferencia Western y cromatografía SDS-PAGE.

Los resultados de los análisis de Transferencia Western se muestran en la Figura 1. El panel A muestra los resultados del Experimento A, y el panel B muestra los resultados del experimento B. Los sobrenadantes se sondaron con un anticuerpo anti-GAG o un anticuerpo anti-GPCR como se indica en la Figura 1.

El panel A de la Figura 1 muestra que la co-expresión de Gag y el GPCR en una célula hospedadora transfectada con ambos vectores conduce a la excreción de VLPs, como se indica por la presencia de una banda Gag positiva en la transferencia Western. Sin embargo, no es detectable esencialmente cantidad alguna de GPCR en las VLPs. Esto confirma que la co-expresión de las moléculas individuales conduce a un escenario en el cual la integración del GPCR en la VLP ocurre únicamente por azar y con frecuencia baja.

5 En contraste, el panel B de la Figura 1 muestra que la co-expresión de Gag y una proteína de fusión GPCR-GAG conduce a un nivel de expresión alto de Gag y GPCR-GAG en las VLPs. Esto confirma que los GPCR están integrados eficientemente en las VLPs, y que los GPCRs son detectables con anticuerpos. Esto significa que el GPCR se visualiza de una manera que lo hace accesible para manipulación molecular ulterior.

10 La Figura 2 muestra una SDS-PAGE de las VLPs del Experimento B. Como puede verse, las VLPs están constituidas esencialmente por dos proteínas: Gag y la proteína de fusión GPCR-GAG.

Ejemplo 4: Repetición con proteínas integrales de membrana adicionales

15 Se repitieron los Ejemplos 1-3 con dos moléculas GPCR adicionales. Todos los resultados pudieron confirmarse con estas moléculas adicionales.

La Figura 3 muestra un análisis comparativo de los tres GPCRs ensayados en la presente descripción. Como puede verse, los tres GPCR podían expresarse eficientemente en la forma de proteínas de fusión GPCR-GAG. Las tasas de visualización eran suficientemente altas para medidas ELISA estándar.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende una proteína de membrana fusionada en el terminal N a una proteína principal de la cápsida de un retrovirus, en donde dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus es una proteína Gag y en donde dicha proteína de membrana no es LAMP-1.
- 5 2. La proteína de fusión conforme a la reivindicación 1, en donde dicha proteína de fusión es capaz de incorporarse o encapsularse en partículas semejantes a virus.
3. La proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína de membrana es un receptor acoplado a proteína G.
- 10 4. La proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho receptor acoplado a proteína G se selecciona de CCR1, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR7, motilina, grelina, PAR1 y PAR2.
5. La proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus se selecciona de la proteína Gag del virus de la leucemia murina de Moloney y la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia humana.
- 15 6. La proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína de fusión comprende un péptido enlazador entre dicha proteína de membrana y dicha proteína principal de la cápsida de un retrovirus.
7. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 20 8. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación siete o el vector de la reivindicación 8.
10. Una partícula semejante a virus que comprende una proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 11. Una partícula semejante a virus conforme a la reivindicación 10, en donde dicha proteína de fusión se visualiza en la superficie de dicha partícula semejante a virus.
12. Un método para identificar un resto de fijación que se fija a una proteína de membrana, comprendiendo dicho método los pasos:

30 (a) proporcionar una proteína de fusión conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-6,
(b) generar VLPs que comprenden la proteína de fusión del paso (a),
(c) poner en contacto las VLPs del paso (b) con una biblioteca de anticuerpos,
(d) lavar las VLPs para eliminar aquellos anticuerpos que no se fijaban a la VLP, y
(e) seleccionar un anticuerpo que es reactivo con la parte de proteína de membrana de dicha proteína de fusión.

FIGURA 1

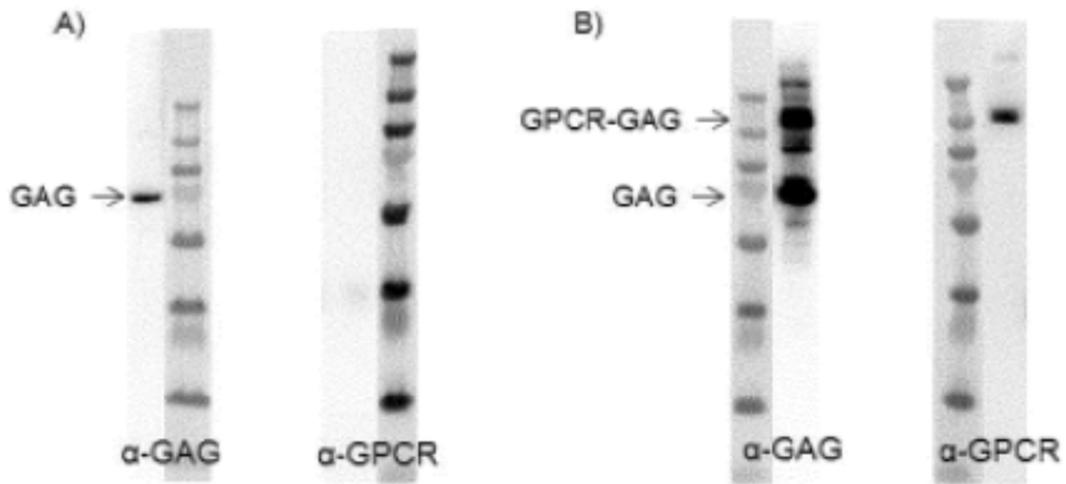


FIGURA 2

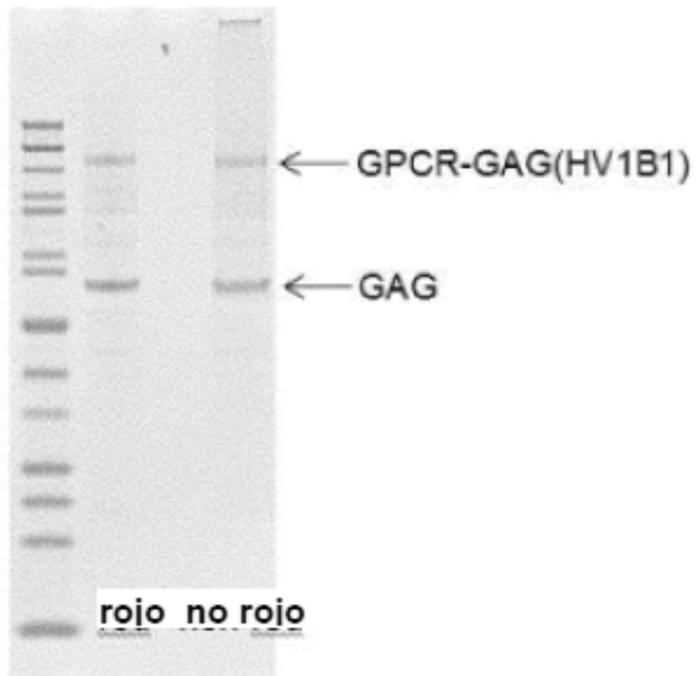


FIGURA 3

