

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 001 108**

(51) Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2018 PCT/AU2018/050299**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018 WO18176103**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2018 E 18775234 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024 EP 3601367**

(54) Título: **Moléculas químicas y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

30.03.2017 AU 2017901152

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

04.03.2025

(73) Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND (100.00%)
St Lucia, Queensland 4072, AU**

(72) Inventor/es:

**CHAPPELL, KEITH, JOSEPH;
WATTERSON, DANIEL y
YOUNG, PAUL, ROBERT**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 001 108 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

Moléculas químicas y usos de las mismas

5 Campo de la invención

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional australiana n.º 2017901152 titulada "Chimeric molecules and uses thereof" presentada el 30 de marzo de 2017.

- 10 La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Generalmente, en el presente documento, se describen polipéptidos químicos basados en proteínas virales de fusión de membrana. De manera más particular, la presente divulgación se refiere generalmente a polipéptidos químicos que comprenden una porción expuesta a la superficie del virión de una proteína de fusión viral y una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga, y a complejos de dichos polipéptidos químicos. La presente divulgación también se refiere al uso de estos complejos en 15 composiciones y métodos para provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, y/o para tratar o impedir una infección por virus con envoltura. La presente divulgación se refiere además generalmente al uso de la fracción estabilizadora de la estructura heteróloga para oligomerización de moléculas heterólogas de interés.

20 Antecedentes de la invención

- Los virus con envoltura, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la gripe y el virus respiratorio sincitial (RSV), requieren la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedadora para entrar en la célula hospedadora e infectarla. Las proteínas virales de fusión facilitan este proceso experimentando reordenamientos estructurales favorables desde el punto de vista energético, desde una conformación metaestable "prefusión" a una conformación altamente estable "posfusión". Este cambio estructural impulsa la fusión de las membranas del virus y de la célula hospedadora, dando como resultado la liberación del genoma viral en la célula. Doyle J et al. han publicado un estudio sobre el reordenamiento conformacional de la proteína de fusión (F) del virus del sarampión (MV) que incluye la identificación de residuos implicados en el control de la estabilidad conformacional 25 de la F, *J Virol*. febrero de 2006;80(3):1524-36.

- Las proteínas virales de fusión se clasifican actualmente en tres clases en función de su arquitectura estructural individual y de las características moleculares que impulsan el proceso de fusión. Tanto las proteínas de fusión de clase I como las de clase III son triméricas en sus conformaciones pre y posfusión, mientras que las proteínas de fusión de clase II son diméricas en su conformación prefusión que, a continuación, se reorganiza en una forma trimérica posfusión. Sin embargo, es posible que en el futuro se puedan identificar nuevas clases de proteínas virales de fusión que comparten algunas características clave en común con estas clases definidas actualmente. Las proteínas de fusión de clase I y de clase III comparten características estructurales sustanciales, incluida la secuencia señal N-terminal y el dominio transmembrana y citoplasmático C-terminal. También comparten mecanismos de fusión 30 similares, con el trímero inicial de prefusión sufriendo una disociación parcial para permitir el importante reordenamiento estructural necesario para formar el trímero de posfusión.

- Las proteínas virales de fusión son excelentes candidatas a vacunas de subunidades, ya que son las dianas principales de las respuestas protectoras de anticuerpos neutralizantes frente a muchos virus con envoltura de importancia médica. La naturaleza metaestable intrínseca de las proteínas de fusión, sin embargo, es un obstáculo importante para el diseño eficaz de vacunas de subunidades, ya que evidencias recientes han demostrado que los anticuerpos de amplia reactividad cruzada y potencialmente neutralizantes provocados durante la infección natural reaccionan principalmente con las formas prefusión y no con las posfusión. Igualmente, la forma de prefusión de las proteínas de fusión de la envoltura viral contiene epítopos que no están presentes en la forma de posfusión (por ejemplo, Magro et al., 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(8):3089-3094). Por tanto, para vacunas, la forma de prefusión estabilizada se considera generalmente más deseable antigenéticamente. Sin embargo, los enfoques tradicionales de expresión recombinante de estas proteínas normalmente dan como resultado una activación prematura y un cambio conformacional a la forma posfusión, estructuralmente más estable. Construcciones de proteínas recombinantes que comprenden diferentes porciones de la hemaglutinina 1 (HA1) del virus aviar H5N1 fusionadas con un dominio "foldon" 45 (Fd), un dominio de trimerización natural de fibratina de fago T4, y Fc de IgG humana se describen en Du L. et al., *PLoS One*. 2013, 8(1):e53568. En Stewart-Jones GB et al. se describe un antígeno de vacuna que comprende la glucoproteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial (RSV) estabilizada en su conformación trimérica prefusión por mutaciones disulfuro ("DS") y de relleno de cavidades ("Cav1") y una cremallera de cisteína, *PLoS One*. 22 de junio de 2015;10(6):e0128779. En el documento WO2014/140083 se describe una construcción recombinante 50 estabilizada en la conformación prefusión del ectodominio de F del RSV fusionado con un motivo de trimerización de cremallera de leucina GCN4.

- En consecuencia, existe una necesidad apremiante de nuevos enfoques para producir proteínas de fusión recombinantes estabilizadas que permanezcan sustancialmente en su forma prefusión para estimular respuestas inmunitarias más eficaces contra los virus con envoltura.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido químérico que comprende un polipéptido de ectodominio de fusión de virus con envoltura conectado operativamente aguas abajo a una fracción heteróloga, estabilizadora de la estructura que comprende regiones complementarias de la primera repetición den héptada (HR1) y de la segunda repetición en héptada (HR2) que se asocian entre sí en condiciones adecuadas para que su asociación forme un haz de dos hélices antiparalelas, en donde las regiones HR1 y HR2 carecen de complementariedad con el polipéptido de ectodominio, de modo que formen preferentemente entre sí un haz de dos hélices antiparalelas, en lugar de con elementos estructurales del polipéptido de ectodominio, en donde el polipéptido de ectodominio comprende al menos un epítopo de prefusión que no está presente en la forma de posfusión de una proteína de fusión de virus con envoltura a la que corresponde el polipéptido de ectodominio. En una realización preferida del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, cada una de las regiones HR1 y HR2 se caracteriza de forma independiente por un patrón de tipos de aminoácidos de 7 residuos repetidos n veces, representado como (a b c d e f g)_n o (d-e-f-g-a-b-c)_n, en donde los elementos del patrón "a" a "g" indican posiciones convencionales de la héptada en las que se localizan los tipos de aminoácidos y n es un número igual o mayor de 2, y al menos el 50 % (o al menos del 51 % a al menos el 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales de la héptada "a" y "d" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófobos y al menos el 50 % (o al menos del 51 % a al menos el 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales de la héptada "b", "c", "e", "f" y "g" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófilos, la distribución resultante entre los tipos de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos permite identificar las regiones de repetición en héptada. En una realización adicional e incluso más preferida del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, una o ambas regiones HR1 y HR2 comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos de la región de repetición en héptada de la proteína de fusión de virus con envoltura de clase I endógena. En una realización preferida adicional del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, las regiones HR1 y HR2 comprenden o consisten en regiones endógenas complementarias de la repetición en héptada A (HRA) y la repetición en héptada B (HRB), respectivamente, de una o más proteínas de fusión de virus con envoltura de Clase I, incluyendo en donde la secuencia de aminoácidos de la región HRA y la secuencia de aminoácidos de la región HRB se derivan de la misma o diferente proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I, preferentemente en donde las regiones HR1 y HR2 se seleccionan independientemente de las regiones HRA y HRB de proteínas de fusión expresadas por ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, coronavirus, filovirus y arenavirus. En realizaciones adicionales o incluso más preferidas del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, la fracción estabilizadora de la estructura (por ejemplo, incluida una o ambas regiones HR1 y HR2) comprende una fracción silenciadora inmunitaria que inhibe la provocación de una respuesta inmunitaria a la fracción estabilizadora de la estructura, preferentemente en donde la fracción inmunosilenciadora es un sitio de glucosilación que es reconocido y glucosilado por una enzima de glucosilación (por ejemplo, una glucosiltransferasa); y/o comprende uno o más aminoácidos no naturales, preferentemente en donde uno o más aminoácidos no naturales permiten el acoplamiento de polietilenglicol, una fracción inmunoestimulante, o un lípido (por ejemplo, para facilitar la formación de vesículas lipídicas, o partículas similares a virus, que muestran el ectodominio del polipéptido químérico, entre otros, para estimular una respuesta inmunitaria del hospedador). En realizaciones adicionales e incluso más preferidas del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el polipéptido de ectodominio corresponde a un ectodominio de proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I, preferentemente en donde el polipéptido de ectodominio comprende una o ambas de una región HRA endógena y una región HRB endógena, preferentemente en donde la proteína de fusión de clase I es una de un virus con proteína de fusión de envoltura de Clase I seleccionado entre los ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, coronavirus, filovirus y arenavirus, o en donde el polipéptido de ectodominio corresponde a un ectodominio de proteína de fusión de virus con envoltura de Clase III, preferentemente en donde la proteína de fusión de clase III es una de un virus con proteína de fusión de envoltura de clase III seleccionado entre los rabdovirus y los herpesvirus, preferentemente en donde el polipéptido de ectodominio (por ejemplo, Clase I o Clase III) comprende o consiste en un polipéptido de ectodominio precursor completo o una porción del mismo, preferentemente en donde la porción o polipéptido de ectodominio carece de uno o más de un péptido señal endógeno, un sitio de escisión de proteasa, una porción de cabeza endógena de un ectodominio, una porción de tallo endógena de un ectodominio, un dominio endógeno similar a la mucina, una región externa proximal de la membrana endógena y un péptido de fusión endógeno, preferentemente en donde uno o más sitios de escisión proteolítica endógena (por ejemplo, uno o más sitios de escisión por furina) de una proteína de fusión de tipo silvestre o de referencia se alteran o suprimen para hacer que el polipéptido de ectodominio sea menos susceptible a la escisión proteolítica por una proteasa. En realizaciones adicionales o incluso más preferidas del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, las regiones HR1 y HR2 de la fracción estabilizadora de la estructura están conectadas por un enlazador, preferentemente en donde el enlazador consiste en aproximadamente 1 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), o consiste en aproximadamente 1 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), o consiste en aproximadamente 50 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), preferentemente en donde el enlazador comprende al menos una fracción seleccionada de una fracción de purificación que facilita la purificación del polipéptido químérico, una fracción inmunomoduladora que modula la respuesta inmunitaria al polipéptido químérico, una fracción específica de la célula y una fracción que confiere flexibilidad estructural. En realizaciones adicionales e incluso más preferidas del polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, las regiones HR1

y HR2 se asocian entre sí para formar un haz de dos hélices antiparalelas en solución acuosa. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de ácido nucleico para la producción endógena de un polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención en un organismo hospedador, en donde el organismo hospedador es preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En una realización preferida de la construcción de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o del polinucleótido de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, dicha construcción de ácido nucleico o dicho polinucleótido comprende ARNm. En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención para su uso en un método para provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de virus con envoltura, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de la construcción de ácido nucleico. En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una o más construcciones de ácido nucleico de acuerdo con el segundo o cuarto aspecto de la invención, en donde la composición es preferentemente una composición inmunomoduladora. En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de un polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, operativamente unido a un elemento regulador operable en la célula hospedadora. En un séptimo aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora que contiene la construcción de ácido nucleico de acuerdo con el sexto aspecto de la invención, preferentemente en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora procariota o una célula hospedadora eucariota. En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un complejo polipeptídico químérico, en donde el método comprende: combinar polipéptidos químéricos de acuerdo con el primer aspecto de la invención en condiciones adecuadas para la formación de un complejo polipeptídico químérico, de modo que se produzca un complejo polipeptídico químérico que comprenda tres subunidades polipeptídicas químéricas y se caracterice por un haz de seis hélices formado por oligomerización de los haces de dos hélices de las respectivas fracciones estabilizadoras de la estructura de los polipéptidos químéricos. En una realización preferida del método de acuerdo con el octavo aspecto de la invención, los polipéptidos químéricos se combinan en solución acuosa. En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a un complejo polipeptídico químérico que comprende tres subunidades polipeptídicas químéricas de acuerdo con el primer aspecto de la invención y se caracteriza por un haz de seis hélices formado por oligomerización de los haces de dos hélices de las respectivas fracciones estabilizadoras de la estructura de los polipéptidos químéricos. En una realización preferida del complejo polipeptídico químérico de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, las subunidades polipeptídicas químéricas comprenden cada una un polipéptido de ectodomino de fusión de virus con envoltura, y en donde el complejo comprende al menos un epítopo de prefusión de una proteína de fusión de virus con envoltura de interés (por ejemplo, una proteína de fusión de virus con envoltura de tipo silvestre), o complejo de la misma, que no está presente en una forma posfusión de la proteína de fusión de virus con envoltura, o complejo de la misma. En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido químérico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un complejo polipeptídico químérico de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o adyuvante. En un decimoprimer aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar un agente que se une a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o a un complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: poner en contacto el agente candidato con un polipéptido químérico que contienen ectodomino de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un complejo polipeptídico químérico de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, en donde el polipéptido de ectodomino corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura, y detectar la unión del agente candidato al polipéptido químérico o al complejo polipeptídico químérico. En una realización preferida del método de acuerdo con el decimoprimer aspecto de la invención, el método comprende además poner en contacto el agente candidato con la proteína de fusión o el complejo de la proteína de fusión y detectar la unión del agente candidato a la proteína de fusión o al complejo, preferentemente en donde el agente candidato forma parte de una biblioteca de compuestos (por ejemplo, biblioteca de moléculas pequeñas o macromoléculas), preferentemente en donde el método comprende además aislar el agente candidato (por ejemplo, una molécula pequeña o macromolécula) de la biblioteca, preferentemente en donde el agente candidato se une específicamente al polipéptido químérico o al complejo polipeptídico químérico, y/o preferentemente en donde el agente candidato se une específicamente a la proteína de fusión o al complejo de la proteína de fusión. En un decimosegundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una molécula de unión a antígeno que es inmunointeractiva con una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: (1) inmunizar un animal con un polipéptido químérico que contenga polipéptido de ectodomino de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un complejo polipéptido químérico que contenga polipéptido de ectodomino de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, o una composición del mismo de acuerdo con el décimo aspecto de la invención, en donde el polipéptido de ectodomino corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura; (2) identificar y/o aislar un linfocito B del animal, que sea inmunointeractivo con la proteína de fusión o el complejo de la misma; y (3) producir la molécula de unión a antígeno expresada por ese linfocito B, o un derivado del mismo que tenga la misma especificidad de unión a epítopo que la molécula de unión a antígeno. En una realización preferida del método de acuerdo con el duodécimo aspecto de la invención, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo (por ejemplo., un anticuerpo neutralizante), y/o el derivado se selecciona entre fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos monocatenarios (scFv) y de dominio (incluidos, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de unión/reconocimiento de antígeno. En un decimocuarto aspecto, la presente invención se refiere a un complejo polipeptídico químérico que contiene ectodomino de fusión de virus con envoltura, de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, o a una

vacuna de ADN o vector/replicante viral capaz de expresar el complejo polipeptídico quimérico, para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, o para tratar o impedir una infección por virus con envoltura, en donde una subunidad de polipéptido de ectodominio del complejo polipeptídico quimérico corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura. La 5 presente invención surge de la determinación de que una conformación prefusión de una proteína de fusión viral puede imitarse conectando operativamente aguas abajo del dominio expuesto a la superficie del virión de la proteína de fusión (también denominado en el presente documento "polipéptido de ectodominio de fusión" o "ectodominio") una fracción heteróloga que comprende un par de regiones complementarias de repetición en héptada que se asocian entre sí para formar un haz de dos hélices antiparalelas. Esta fracción actúa como una especie de "pinza molecular" 10 que estabiliza el polipéptido de ectodominio de fusión e impide que se reordene a una conformación posfusión. El enfoque de pinza molecular de la presente invención se ha utilizado para producir polipéptidos quiméricos que imitan las conformaciones de prefusión del virus de la gripe, RSV, VIH, el virus del sarampión y el virus del Ébola, respectivamente y, por tanto, se presta como plataforma para producir miméticos de las proteínas de fusión de la 15 envoltura viral en una conformación de prefusión. Los polipéptidos quiméricos así producidos pueden autoensamblarse para formar un complejo artificial de proteínas de fusión de virus con envoltura que comprenda un oligómero del polipéptido quimérico y que imita la conformación prefusión de un complejo nativo de proteínas de fusión de virus con envoltura. Este autoensamblaje permite producir fácilmente los complejos artificiales entre otros en sistemas de 20 expresión recombinante. Los complejos artificiales producidos utilizando los polipéptidos quiméricos de la invención son útiles en métodos y composiciones para estimular una respuesta inmunitaria, incluido el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, al complejo nativo de proteínas de fusión de virus con envoltura, como se describe a continuación, en el presente documento.

Por consiguiente, el polipéptido quimérico comprende un polipéptido de ectodominio de fusión de virus con envoltura operativamente conectado aguas abajo a una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga que comprende 25 regiones complementarias de primera repetición en héptada (HR1) y segunda repetición en héptada (HR2) que se asocian entre sí en condiciones adecuadas para su asociación (por ejemplo, en solución acuosa) para formar un haz de dos hélices antiparalelas. Las regiones HR1 y HR2 carecen de complementariedad con el polipéptido de ectodominio, de modo que forman preferentemente un haz de dos hélices antiparalelas entre sí, en lugar de con 30 elementos estructurales del polipéptido de ectodominio. En algunas realizaciones, cada una de las regiones HR1 y HR2 se caracteriza de forma independiente por un patrón de tipos de aminoácidos de 7 residuos repetidos n veces, representado como (a-b-c-d-e-f-g)_n o (d-e-f-g-a-b-c)_n, en donde los elementos del patrón "a" a "g" indican posiciones convencionales de la héptada en las que se localizan los tipos de aminoácidos y n es un número igual o mayor de 2, y al menos el 50 % (o al menos del 51 % a al menos el 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las 35 posiciones convencionales de la héptada "a" y "d" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófobos y al menos el 50 % (o al menos del 51 % a al menos el 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales de la héptada "b", "c", "e", "f" y "g" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófilos, la distribución resultante entre los tipos de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos permite identificar las regiones de repetición en héptada. En algunas realizaciones, una o ambas regiones HR1 y HR2 comprenden o consisten en una secuencia de 40 aminoácidos de la región de repetición en héptada de la proteína de fusión de virus con envoltura de clase I endógena. En ejemplos representativos de este tipo, las regiones HR1 y HR2 comprenden o consisten en regiones endógenas complementarias de la repetición en héptada A (HRA) y la repetición en héptada B (HRB), respectivamente, de una o más proteínas de fusión de virus con envoltura de Clase I. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la 45 región HRA y la secuencia de aminoácidos de la región HRB se derivan de la misma proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la región HRA y la secuencia de aminoácidos de la región HRB se derivan de diferentes proteínas de fusión de virus con envoltura de Clase I. En ejemplos representativos, las regiones HR1 y HR2 se seleccionan independientemente de las regiones HRA y HRB de las proteínas de fusión expresadas por ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, coronavirus, filovirus y arenavirus.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido de ectodominio corresponde a un ectodominio de proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I. En ejemplos representativos de este tipo, el polipéptido de ectodominio comprende una región HRA endógena y una región HRB endógena, o ambas. Entre los virus con envoltura y proteínas de fusión de Clase I no limitativos se incluyen los ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, coronavirus, filovirus y arenavirus.

55 En otras realizaciones, el polipéptido de ectodominio corresponde a un ectodominio de proteína de fusión de virus con envoltura de Clase III. Entre los virus con envoltura representativos con proteínas de fusión de clase III se incluyen los rabdovirus y los herpesvirus.

60 El polipéptido de ectodominio (por ejemplo, Clase I o Clase III) puede comprender o consistir en un polipéptido de ectodominio precursor completo o una porción del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido de ectodominio carece de uno cualquiera o más de un péptido señal endógeno, una porción de cabeza endógena de un ectodominio, una porción de tallo endógena de un ectodominio, un dominio endógeno similar a la mucina, una región externa proximal de la membrana endógena y un péptido de fusión endógeno. El polipéptido de ectodominio comprende adecuadamente al menos un epítopo de prefusión que no está presente en la forma de posfusión de una proteína de fusión de virus con envoltura a la que corresponde el polipéptido de ectodominio.

65 En algunas realizaciones, las regiones HR1 y HR2 de la fracción estabilizadora de la estructura están conectadas por

- un enlazador, que consiste generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), y normalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos). El enlazador puede comprender al menos una fracción seleccionada de una fracción de purificación que
- 5 facilita la purificación del polipéptido quimérico, una fracción inmunomoduladora que modula la respuesta inmunitaria al polipéptido quimérico, una fracción de direccionamiento celular que dirige el polipéptido quimérico a un subtipo celular específico y una fracción estructural que confiere flexibilidad.
- El polipéptido quimérico puede producirse sintéticamente o por medios recombinantes. En los casos en los que el
- 10 polipéptido quimérico se produce de forma recombinante, la presente invención proporciona en un sexto aspecto una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para un polipéptido quimérico de acuerdo con el primer aspecto, operativamente unido a un elemento regulador operable en la célula hospedadora.
- En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que contiene la construcción de
- 15 ácido nucleico de acuerdo con el sexto aspecto de la invención. La célula hospedadora puede ser una célula hospedadora procariota o eucariota.
- Además de su utilidad en la estabilización del polipéptido de ectodomio contra el reordenamiento a una conformación posfusión, la fracción estabilizadora de la estructura heteróloga es útil para oligomerización en oligómeros de cualquier
- 20 molécula heteróloga de interés, en particular, los trímeros. Por consiguiente, en otro aspecto, también se describe ampliamente en el presente documento, pero no de tal manera que estén cubiertos por las reivindicaciones, un polipéptido quimérico que comprende una molécula proteica operativamente conectada en aguas abajo a una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga que comprende regiones complementarias de primera repetición en héptada (HR1) y segunda repetición en héptada (HR2) que se asocian entre sí en condiciones adecuadas para su asociación
- 25 (por ejemplo, en solución acuosa) para formar un haz de dos hélices antiparalelas, como se ha descrito anteriormente y en cualquier otro sitio del presente documento.
- Los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden autoensamblarse en condiciones adecuadas (por ejemplo, en solución acuosa) para formar un complejo polipeptídico quimérico. Por consiguiente, en un octavo aspecto,
- 30 la presente invención proporciona un método para proporcionar un complejo polipeptídico quimérico, en donde el método comprende: combinar polipéptidos quiméricos de acuerdo con el primer aspecto de la invención en condiciones (por ejemplo, en solución acuosa) adecuadas para la formación de un complejo polipeptídico quimérico, de modo que se produzca un complejo polipeptídico quimérico que comprenda tres polipéptidos quiméricos y se caracterice por un haz de seis hélices formado por oligomerización de los haces de dos hélices de las respectivas
- 35 fracciones estabilizadoras de la estructura de los polipéptidos quiméricos.
- En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un complejo polipeptídico quimérico que comprende tres polipéptidos quiméricos de acuerdo con el primer aspecto de la invención y se caracteriza por un haz de seis hélices formado por oligomerización de los haces de dos hélices de las respectivas moléculas estabilizadoras de la estructura
- 40 de los polipéptidos quiméricos. En algunas realizaciones, el complejo polipeptídico quimérico formado por autoensamblaje del polipéptido quimérico comprende al menos un epítopo de prefusión de una proteína de fusión de virus con envoltura de interés (por ejemplo, una proteína de fusión de virus con envoltura de tipo silvestre), o complejo de la misma, que no está presente en una forma posfusión de la proteína de fusión de virus con envoltura, o complejo de la misma.
- 45 La presente invención en un décimo aspecto proporciona una composición que comprende un polipéptido quimérico de acuerdo con el primer aspecto o un complejo polipéptido quimérico de acuerdo con el noveno aspecto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o adyuvante. En algunas realizaciones, la composición es una composición inmunomoduladora.
- 50 El complejo polipeptídico quimérico de la presente invención puede ser útil para provocar una respuesta inmunitaria en sujetos o animales de producción, a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión. Por consiguiente, en el presente documento, también se describe, pero se reivindica, un método para provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o a un complejo de la proteína de fusión,
- 55 en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto un complejo o composición polipeptídica quimérica, como se ha descrito anteriormente y en cualquier otro sitio del presente documento, en donde un polipéptido de ectodomio del complejo polipeptídico quimérico corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura.
- En un decimoprimer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un agente (por ejemplo, una molécula pequeña o macromolécula) que se une con una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: poner en contacto el agente candidato con un polipéptido quimérico que contienen ectodomio de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un complejo polipeptídico quimérico de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, en donde el polipéptido de ectodomio corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura, y detectar la unión del agente candidato al polipéptido quimérico o al complejo polipeptídico quimérico. En realizaciones específicas, el método comprende además poner en contacto el agente candidato con la proteína de fusión o el complejo de la proteína de fusión y detectar la unión del agente

candidato a la proteína de fusión o al complejo. En realizaciones específicas, el agente candidato forma parte de una biblioteca de compuestos (por ejemplo, biblioteca de moléculas pequeñas o macromoléculas). En algunas de estas realizaciones, el método comprende además aislar el agente candidato de la biblioteca. Convenientemente, el agente candidato se une específicamente al polipéptido químérico o al complejo polipeptídico químérico, y preferentemente a la proteína de fusión o al complejo de la proteína de fusión.

En un decimosegundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo tal como un anticuerpo neutralizante) que es inmunointeractivo con una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: (1) inmunizar a un animal con un polipéptido químérico que contenga polipéptido de ectodominio de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un complejo polipeptídico químérico de acuerdo con el noveno aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el décimo aspecto de la invención, en donde el polipéptido de ectodominio corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura; (2) identificar y/o aislar un linfocito B del animal, que sea inmunointeractivo con la proteína de fusión o el complejo de la misma; y (3) producir la molécula de unión a antígeno expresada por ese linfocito B, o un derivado del mismo que tenga la misma especificidad de unión a epítopo que la molécula de unión a antígeno.

En el presente documento, también se proporciona una molécula de unión a antígeno producida por los métodos de inmunización de acuerdo con el duodécimo aspecto de la invención, o una molécula de unión a antígeno derivada con la misma especificidad de unión a epítopo que la molécula de unión a antígeno. La molécula de unión a antígeno derivada puede seleccionarse entre fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos monocatenarios (scFv) y de dominio (incluidos, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de unión/reconocimiento de antígeno.

El polipéptido químérico que contiene el polipéptido de ectodominio de fusión de virus con envoltura o complejo del mismo, así como la composición y la molécula de unión al antígeno, como se ha descrito anteriormente y en cualquier otro sitio del presente documento, también son útiles para tratar o impedir las infecciones por virus con envoltura. Cualquier referencia en el presente documento a métodos de/para tratamiento por terapia basados en compuestos o composiciones de la presente invención debe interpretarse como referencias a dichos compuestos o composiciones para su uso en dichos métodos. Por consiguiente, en el presente documento, también se describe, pero se reivindica, un método para tratar o impedir una infección por virus con envoltura en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido químérico que contiene ectodominio de fusión de virus con envoltura, o un complejo de la misma, composición o molécula de unión a antígeno, como se ha descrito anteriormente y en cualquier otro sitio del presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una representación gráfica que muestra la reactividad de la F del RSV ELISA con anticuerpo monoclonal específico de conformación. A. Anticuerpo monoclonal específico de prefusión D25 (Zhao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000. 97(26): 14172-7) se une a la F del RSV estabilizada con pinza químérica con una afinidad de 23,4±12,5 nM pero no se une al correspondiente ectodominio de F no estabilizado, F sol. B. El anticuerpo monoclonal específico de prefusión D25 se une al mutante DS cav de la F del RSV estabilizado con pinza químérica y a la F del RSV estabilizada con foldon químérico de control con afinidades comparables (1,2±0,2 nM y 1,3±0,2 nM, respectivamente), pero no se une al correspondiente ectodominio de F no estabilizado, F sol. C. El anticuerpo monoclonal específico de prefusión de amplia neutralización cruzada MPE8 (Corti et al., *Nature* 2013. 501(7467):439-43) se une al mutante DS cav de la F del RSV estabilizada con pinza químérica y a la F del RSV estabilizada con foldon químérica de control con afinidades comparables (7,6±1,5 nM y 10,8±2,4 nM, respectivamente), pero no se une al correspondiente ectodominio de F no estabilizado, F sol.

La figura 2 es una representación gráfica que muestra la reactividad ELISA de la gripe H3 con anticuerpo monoclonal específico de conformación. A. El anticuerpo específico de la cabeza C05 (Ekiert et al., *Nature* 2012. 489(7417): 526-32) se une de forma similar a H3sol, H3pinza y QIV, sin embargo, el anticuerpo monoclonal específico a el tallo, de prefusión CR8043 (Friesen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014. 111(1): 445-50) se une a la HA de la gripe estabilizada con pinza químérica con una afinidad de 3,3 ± 0,8 nM, pero no se une al ectodominio de HA correspondiente ni a la QIV comercial.

La figura 3 es una representación gráfica que muestra la separación por cromatografía de exclusión por tamaño del estado oligomérico de las proteínas. La HA de la gripe estabilizada con pinza químérica se presenta como un trímero soluble como se observa a través de su elución desde una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL a aproximadamente 11 ml. En comparación, el ectodominio de HA correspondiente expresado de forma aislada eluye de la columna a aproximadamente 8 ml y 12 ml, lo que concuerda con la presencia de una porción de la proteína en forma de agregados y otra porción en forma de monómeros. Se ha demostrado previamente que la forma posfusión de la HA de la gripe puede disociarse en una forma monomérica o agregarse vía la exposición del péptido de fusión (Weldon et al., *PLoS One* 2010. 5(9)). La QIV comercial eluyó a 8 ml, lo que indica la presencia de agregados de alto peso molecular.

- 5 La figura 4 es una representación gráfica que muestra la respuesta inmunitaria neutralizante producida tras la vacunación. Los sueros de ratones vacunados con la vacuna comercial (QIV) mostraron neutralización frente a la gripe A/Hebei Baoding Anguo/51/2010 (H3N2) con un valor CI₅₀ aproximado de 180. En comparación, la HA de la gripe estabilizada con pinza químérica mostró un nivel muy superior de actividad neutralizante del virus, con un valor de CI₅₀ de 1:14.000 (IC 95 %: 11.000-17.000), mientras que los sueros de ratones vacunados con el ectodominio de HA correspondiente no mostraron actividad neutralizante ni siquiera a la dosis más alta probada de 1:20. La preincubación con H3sol, QIV no afectó a la neutralización de H3N2, sin embargo, la preincubación con H3pinza eliminó la neutralización de H3N2.
- 10 10 La figura 5 es una representación gráfica que muestra la especificidad de subdominio de la respuesta inmunitaria inducida. Sueros de ratones vacunados con H3sol, H3pinza o la vacuna comercial (QIV) mostraron una reactividad diferencial con los subdominios de cabeza y tallo de H3. Los sueros de ratones inmunizados con HA de la gripe estabilizada con pinza químérica mostraron la mayor reactividad al dominio de tallo (aproximadamente el 25 % de la respuesta específica de H3 total), mientras que en los sueros de ratones inmunizados con H3sol y QIV este porcentaje era mucho menor (el 1 % y el 4 %, respectivamente).
- 15 15 La figura 6 es una representación gráfica que muestra la reactividad cruzada de H5. Se usó ELISA para medir la reactividad con H5. Los títulos de criterio de evaluación se calcularon como la dilución máxima que producía una reactividad superior al fondo + 3 desviaciones estándar. Sueros de ratones vacunados con H3sol, H3pinza, vacuna comercial (QIV), H1pinza y H5pinza mostraron una reactividad diferencial con H5. Los sueros de ratones inmunizados con H3pinza o H1pinza mostraron una reactividad cruzada mucho mayor con H5 que con QIV (27 veces más y 81 veces más, respectivamente).
- 20 20 La figura 7 es una representación gráfica que muestra el subdominio responsable de la reactividad cruzada con H5. Se usó ELISA para medir la reactividad con H5. Los títulos de criterio de evaluación se calcularon como la dilución máxima que produce una reactividad superior al fondo + 3 desviaciones estándar. Se muestra la reactividad con H5 total para sueros de ratón (barras grises). Se utilizó la preincubación de sueros con H3tallo, para preabsorber los anticuerpos específicos del tallo antes del ELISA (barras blancas) o se añadió el anticuerpo monoclonal Fl6v3 para superar a los anticuerpos específicos del tallo (barras negras).
- 25 25 La Figura 8 es una representación gráfica que muestra la purificación de una proteína de la espícula ("spike") de MERS soluble trimérica estabilizada con pinza. **A.** SDS-PAGE de la proteína de la espícula de MERS estabilizada con pinza purificada del sobrenadante de CHO tras la expresión. La banda de proteína de aproximadamente 200 kDa tiene el tamaño aproximado correcto para la proteína de MERS monomérica resultante, incluyendo los glicanos asociados, y no es visible en una purificación de control a partir del sobrenadante de CHO. **B.** Cromatografía de exclusión por tamaño de la proteína de la espícula de MERS estabilizada con pinza en una columna Superdex 6 10/300 GL. La elución de la proteína principal a 12,5 ml es indicativa de aproximadamente 600 kDa, que es el tamaño correcto para la proteína de MERS trimérica no agregada incluyendo los glicanos asociados.
- 30 30 La figura 9 es una representación gráfica que muestra la purificación de una proteína GP del Ébola estabilizada con pinza que carece del dominio similar a la mucina a partir de sobrenadante de CHO. El análisis por SDS-PAGE sin DTT muestra una banda de proteína de aproximadamente 100 kDa que tiene el tamaño correcto para la proteína GP del Ébola resultante (GP1 y GP2 unidas por el puente disulfuro nativo) incluyendo los glicanos asociados. El análisis por SDS-PAGE con DTT muestra dos bandas de proteína de aproximadamente 60 kDa y 30 kDa que son los tamaños correctos para la proteína GP del Ébola escindida por Furina incluyendo los glicanos asociados.
- 35 35 La figura 10 es una representación gráfica que muestra la reactividad de la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) de ELISA con anticuerpos monoclonales altamente neutralizantes. Los anticuerpos monoclonales Kz52, 1H3, 2G4, 4G7 y 13C6 (Murin et al., PNAS. 2014 11(48): 17182-7) se unen con gran afinidad a la GP pinza del Ébola (que carece del dominio similar a la mucina).
- 40 40 La figura 11 es una representación gráfica que ilustra la estabilidad térmica de la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina). La GP pinza del Ébola purificada (carente del dominio similar a la mucina) se unió a una placa de ELISA y se secó en presencia de sacarosa al 30 %. La reactividad con anticuerpos monoclonales altamente neutralizantes Kz52, 4G7 y 13C6 (Murin et al., PNAS. 2014 11(48):17182-7) se midió directamente o después de 14 días de incubación a 37 °C. No se observaron cambios significativos en la reactividad, lo que indica que la proteína estabilizada con pinza es estable a altas temperaturas durante períodos prolongados.
- 45 45 La figura 12 es una representación gráfica que muestra la respuesta inmunitaria a la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) tras la inmunización de ratones BALB/C. Se inmunizaron 3 grupos de 5 ratones por vía intradérmica con 1 µg de GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina), como control negativo 1 µg de GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) + 3 ug de adyuvante de saponina Quil A o PBS. Se inmunizaron los ratones 3 veces en los días 0, 28 y 56 y se extrajo sangre en los días 27 (sangrado1), 55

(sangrado2) y 84 (sangrado3). **A.** El anticuerpo específico para la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) dentro de suero sanguíneo se cuantificó mediante ELISA. **B.** El título de criterio de evaluación se calculó calculando la última dilución capaz de producir una lectura por encima del fondo + 3 desviaciones estándar.

5 La figura 13 es una representación gráfica que ilustra la capacidad de la respuesta inmunitaria a la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) tras la inmunización de ratones BALB/C para neutralizar el virus del Ébola vivo, cepa Zaire. El suero de ratones inmunizados con 1 µg de la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) + 3 µg del adyuvante de saponina Quil A fue capaz de neutralizar el virus del Ébola vivo. Se calculó que el título medio geométrico que producía una reducción del 50 % de las unidades formadoras de placa era de 52,8 (IC 95 %: 24,5-114,0).

10 La Figura 14 es una representación gráfica que muestra el inmunosilenciamiento del dominio de pinza mediante la incorporación de sitios de glucosilación ligados a N. Se produjeron cuatro mutaciones separadas dentro de la HRB de la secuencia de la pinza basándose en la SSM basada en GP160 del VIH en la GP pinza del Ébola (que carece del dominio similar a la mucina). La reactividad de los sueros de ratones inmunizados con la HA de la gripe estabilizada con pinza químérica se probó frente a la GP pinza del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) que estaba estabilizada con la secuencia de pinza idéntica o con secuencias de pinza que incorporaban glucosilaciones en uno de los cuatro sitios potenciales. La reactividad se redujo significativamente mediante la glucosilación en cada sitio individual, lo que apoya la hipótesis de que este método puede usarse para reducir la reactividad al dominio de pinza. El correcto plegamiento de la GP del Ébola (carente del dominio similar a la mucina) que incorpora secuencias de pinza mutadas se confirmó mediante la medición de la afinidad por Kz52.

15 La Figura 15 es una representación fotográfica que muestra SDS-PAGE de antígenos estabilizados con pinza purificados de ocho virus. Las bandas designadas con flechas naranjas indican productos no escindidos y las flechas amarillas indican productos escindidos. El peso molecular esperado de los antígenos son: HApinza de la gripe = aproximadamente 85 kDa, Fpinza del RSV = aproximadamente 65 kDa, GPPinza del Ébola = aproximadamente 72 kDa, Fpinza del Nipah aproximadamente 64, Spinza de MERS aproximadamente 200 kDa, GPCpinza de Lassa = aproximadamente 75 kDa, Sarampión = aproximadamente 65 kDa y Gbpinza del HSV2 = aproximadamente 100 kDa.

20 25 30 La Figura 16 es una representación gráfica que muestra los resultados de un estudio de protección en ratones tras una exposición al virus de la gripe H1N1pdm: (A/B) Los ratones (n=5) se vacunaron con H1sol, H1foldon o H1pinza derivados de la cepa Cal/09 (H1N1pdm) y, a continuación, se expusieron a la cepa de gripe emparejada. (C/D) Los ratones se vacunaron con H3sol, H3foldon o H3pinza derivado de la cepa Switz/13 (H3N2) y, a continuación, se expusieron a la cepa divergente Cal/09 (H1N1pdm).

35 40 45 La Figura 17 es una representación gráfica que muestra la estabilidad térmica de antígenos estabilizados con pinza a 43 °C durante 72 h. Los candidatos a vacuna estabilizados con pinza y las proteínas de control se incubaron a 43 °C durante 72 h. y la reactividad con tres mAbs bien caracterizados para cada antígeno se usó como medida de la estabilidad térmica **A.** Se usaron mAbs específicos de prefusión D25, AM22 y MPE8 para comparar Fpinza del RSV y el enfoque alternativo que utiliza el dominio de trimerización foldon y mutaciones estabilizadoras basadas en la estructura (McLellan et al., *Science* 2013. 342(6158): págs. 592-8). **B.** Los mAbs FI6V3 y CR6261 específicos del tallo de HA y el mAb 5J8 específico de la cabeza de HA se utilizaron para comparar la H1pinza de la gripe y el enfoque alternativo que utiliza el dominio de trimerización foldon.

50 55 60 La Figura 18 es una representación gráfica que muestra la respuesta inmunitaria a las vacunas de subunidades estabilizadas con pinza. Se probó la capacidad de neutralizar el RSV en sueros de ratones inmunizados con Fpinza, Fsol o Fdscav foldon del RSV (McLellan et al., *Science* 2013. 342(6158):592-598).

La Figura 19 es una representación gráfica y fotográfica que muestra que la inclusión de la pinza molecular facilita la estabilización de la conformación trimérica prefusión. La glucoproteína de fusión del virus Nipah estabilizada con pinza se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El volumen de elución en la columna superdex 200 se correlaciona con el peso molecular esperado de la proteína trimérica soluble. La microscopía electrónica de tinción negativa (recuadro) confirma la presencia de conformación de la proteína prefusión homogénea.

La Figura 20 es una representación gráfica que muestra la respuesta inmunitaria a las vacunas de subunidades estabilizadas con pinza. Se probó la capacidad de los sueros de ratones inmunizados con Fpinza del Nipah para neutralizar el virus Nipah. En todos los paneles, los valores mostrados son medias geométricas de ratones individuales con barras de error que indican la desviación estándar geométrica.

La figura 21 es una representación gráfica y fotográfica que muestra que la inclusión de la pinza molecular facilita la estabilización de la estructura trimérica de una proteína de fusión viral de clase 3. La glucoproteína B (gB) de fusión del HSV2 estabilizada con pinza se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El volumen de elución en la columna superosa 6 se correlaciona con el peso molecular esperado de la proteína trimérica soluble. La microscopía electrónica de tinción negativa (recuadro) confirma la presencia de conformación trimérica homogénea similar a la estructura publicada (Heldwein et al., *Science* 2006. 313(5784): 217-20). Se ha demostrado

que esta conformación se une a la mayoría de los anticuerpos neutralizantes (Cairns et al., J. Vi, 2014. 88(5): 2677-2689).

5 Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento, se describen los métodos y materiales preferentes. Para los fines de la presente invención, a continuación, se definen los siguientes términos y expresiones.

10 En el presente documento, los artículos "un" y "uno(a)" se utilizan para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

15 Como se utiliza en el presente documento, "y/o" se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (o).

20 Además, los términos "aproximadamente" y "aproximado", como se utilizan en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, dosis, tiempo, temperatura, actividad, nivel, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso, posición, longitud y similares, pretende abarcar variaciones del $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ o incluso el $\pm 0,1\%$ de la especificada cantidad, dosis, tiempo, temperatura, actividad, nivel, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso, posición, longitud y similares. En los casos en los que los términos "aproximadamente" y "aproximado" se utilizan en relación con la localización o posición de regiones dentro de un polipéptido de referencia, estos términos abarcan variaciones de \pm hasta 20 residuos de aminoácidos, \pm hasta 15 residuos de aminoácido, \pm hasta 10 residuos de aminoácido, \pm hasta 5 residuos de aminoácido, \pm hasta 4 residuos de aminoácido, \pm hasta 3 residuos de aminoácido, \pm hasta 2 residuos de aminoácidos o incluso ± 1 residuo de aminoácidos.

25 El término "adyuvante", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto que, cuando se utiliza junto con un inmunógeno específico (por ejemplo, un polipéptido químérico o complejo de la presente invención) en una composición, aumentará la respuesta inmunitaria resultante, incluida la intensificación o ampliación de la especificidad de la respuesta inmunitaria celular o del anticuerpo.

30 En el presente documento, el término "agente" se utiliza indistintamente con "compuesto" para referirse a cualquier compuesto o sustancia tal como, pero sin limitación, una molécula pequeña, ácido nucleico, polipéptido, péptido, fármaco, ion, etc. Un "agente" puede ser cualquier sustancia química, entidad o fracción, incluidas, sin limitación, entidades proteicas y no proteicas sintéticas y de origen natural. Un agente puede ser un ácido nucleico, análogos de ácido nucleico, proteínas, anticuerpos, péptidos, aptámeros, oligómero de ácidos nucleicos, aminoácidos o hidratos de carbono, incluidas, sin limitación, proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glucoproteínas, ARNip, lipoproteínas, aptámeros y modificaciones y combinaciones de los mismos, etc. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, y análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo, puede ser APN, pAPNc y LNA. Un ácido nucleico puede ser de monocatenario o bicatenario, y puede seleccionarse de un grupo que comprende; ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, APN, etc. Dichas secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, pequeñas secuencias de ácido nucleico inhibidoras, por ejemplo, pero sin limitación, iARN, iARNhc, ARNip, micro iARN (iARNm), oligonucleótidos antisentido, etc. Un agente proteico y/o peptídico o un fragmento del mismo, pueden ser cualquier proteína de interés, por ejemplo, pero sin limitación; proteínas mutadas; proteínas terapéuticas; proteínas truncadas, en donde la proteína está normalmente ausente o se expresa a niveles más bajos en la célula. Las proteínas de interés pueden seleccionarse de un grupo que comprende; proteínas mutadas, proteínas modificadas genéticamente, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas químéricas, anticuerpos, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizados, anticuerpos químéricos, proteínas modificadas y fragmentos de los mismos.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" y sus expresiones gramaticalmente equivalentes (por ejemplo, "antigénico") se refieren a un compuesto, composición o sustancia que se puede unir específicamente por los productos de la inmunidad humoral o celular específica, tal como una molécula de anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermediarios simples, azúcares (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como hidratos de carbono complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, protozoos y otros antígenos parásitarios, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunes, alergia y rechazo del injerto, toxinas y otros antígenos diversos.

Por "molécula de unión a antígeno" se entiende una molécula que tiene afinidad de unión por un antígeno diana. Se entenderá que esta expresión se extiende a las inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina y estructuras proteicas no derivadas de inmunoglobulina que presentan actividad de unión a antígenos. Las moléculas de unión a antígeno representativas que son útiles en la práctica de la presente invención incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos monocatenarios (scFv) y de dominio (incluidos, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de unión/reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase del mismo) y no es necesario que el anticuerpo sea de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, las inmunoglobulinas pueden asignarse a distintas clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las moléculas de unión a antígenos abarcan también los anticuerpos diméricos, así como formas multivalentes de anticuerpos. Los anticuerpos de unión a antígeno pueden ser anticuerpos quiméricos, en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.816.567; y Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). También se contemplan anticuerpos humanizados, los cuales generalmente se producen transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad (CDR) desde cadenas variables pesadas y ligeras de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de roedor, preferentemente de ratón) en un dominio variable humano. A continuación, residuos típicos de los anticuerpos humanos se sustituyen en las regiones marco de sus análogos no humanos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos humanizados obvia los problemas potenciales asociados a la inmunogenicidad de regiones constantes no humanas. Técnicas generales de clonación de dominios variables de inmunoglobulina no humana, en particular murinos, son descritas, por ejemplo, por Orlandi et al. (1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833). Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados son descritas, por ejemplo, por Jones et al. (1986) *Nature* 321:522), Carter et al. (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285), Sandhu (1992, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437), Singer et al. (1993, *J. Immun.* 150: 2844), Sudhir (ed., *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc. 1995), Kelley ("Engineering Therapeutic Antibodies", en *Protein Engineering: Principles and Practice* Cleland et al. (eds.), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996), y por Queen et al., patente de EE. UU. N.º 5.693.762 (1997). El anticuerpo humanizado incluye anticuerpos "primatizados" en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés. También se contemplan como moléculas de unión a antígeno los anticuerpos humanizados.

El término "antiparalelo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero proteico en el que las regiones o segmentos del polímero tienen una orientación paralela pero polaridades opuestas.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un polipéptido o complejo químico de la presente invención en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluyen macromoléculas tales como proteínas y otros productos biológicos. La expresión "se une específicamente" cuando se refiere a una molécula de unión a antígeno puede utilizarse indistintamente con el término "específicamente inmunointeractiva" y similares para referirse a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un polipéptido o complejo químico de la presente invención en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. En las condiciones de ensayo designadas, una molécula se une específicamente a un polipéptido o complejo químico de la invención y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas (por ejemplo, proteínas o antígenos) presentes en la muestra. Puede utilizarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar las moléculas de unión a antígeno que sean específicamente inmunointeractivas con un polipéptido químico o complejo de la invención. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan habitualmente para seleccionar anticuerpos monoclonales que son específicamente inmunointeractivos con una proteína. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica.

El término "químico", cuando se utiliza en referencia a una molécula, significa que la molécula contiene porciones que se derivan de, se obtienen o se aislan de, o se basan en dos o más orígenes o fuentes diferentes. Por tanto, un polipéptido es químico cuando comprende dos o más secuencias de aminoácidos de origen diferente e incluye (1) secuencias polipeptídicas que no se encuentran juntas en la naturaleza (es decir, al menos una de las secuencias de aminoácidos es heteróloga con respecto a al menos una de sus otras secuencias de aminoácidos), o (2) secuencias de aminoácidos que no están naturalmente contiguas.

Por "secuencia codificante" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuya al código del producto polipeptídico de un gen o del producto final de ARNm de un gen (por ejemplo, el producto de ARNm de un gen tras el corte y empalme). Por el contrario, la expresión "secuencia no codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuya al código para el producto polipeptídico de un gen o para el producto final de ARNm de un gen.

Las expresiones "superhélice" o "estructura de superhélice" se utilizan indistintamente para referirse a un motivo estructural de las proteínas, en el que dos o más α -hélices (con mayor frecuencia de 2 a 7 α -hélices) se enrollan entre sí como las hebras de una cuerda (los dímeros y los trímeros son los tipos más comunes). Muchas proteínas de tipo 5 superhélice están implicadas en importantes funciones biológicas como la regulación de la expresión génica, por ejemplo, factores de transcripción. Las superhélices a menudo, pero no siempre, contienen un patrón repetido, hpphpp o hppphpp, de residuos de aminoácidos hidrófobos (h) y polares (p), denominado repetición en héptada (véase más adelante). El plegamiento de una secuencia con este patrón de repetición en una estructura secundaria 10 en α -hélice hace que los residuos hidrófobos se presenten como una 'franja' que se enrolla suavemente alrededor de la hélice de manera levógira, formando una estructura anfipática. La forma más favorable para que dos de dichas hélices se dispongan en un ambiente lleno de agua es que las hebras hidrófobas se envuelvan una contra otra, dispuestas entre los aminoácidos hidrófilos. Por tanto, se trata del enterramiento de superficies hidrófobas, que proporciona la fuerza impulsora termodinámica para la oligomerización de las hélices α . El empaquetamiento en una 15 interfaz en superhélice es excepcionalmente apretado. Las hélices α pueden ser paralelas o antiparalelas, y habitualmente adoptan una superhélice levógira. Aunque desaprobado, también se han observado en la naturaleza y en proteínas diseñadas algunas superhélices dextrógiros. El término "superhélice" o la expresión "estructura de superhélice" estarán claros para el experto en la materia basándose en el conocimiento general común. A este 20 respecto, se denominan en particular los artículos de revisión relativos a las estructuras superhélice, tal como, por ejemplo, Cohen y Parry (1990. *Proteins* 7:1-15); Kohn y Hodges (1998. *Trends Biotechnol* 16:379-389); Schneider et al. (1998. *Fold Des* 3:R29-R40); Harbury et al. (1998. *Science* 282:1462-1467); Mason y Arndt (2004. *Chem-BioChem* 5:170-176); Lupas y Gruber (2005. *Adv Protein Chem* 70:37-78); Woolfson (2005. *Adv Protein Chem* 70:79-112); Parry et al. 25 (2008. *J. Struct. Biol.* 163:258-269); y Mcfarlane et al. (2009. *Adv. Pharmacol* 625:101-107).

Como se utiliza en el presente documento, el término "complementario" y expresiones gramaticalmente equivalentes 30 del mismo se refieren a la característica de dos o más elementos estructurales (por ejemplo, péptido, polipéptido, ácido nucleico, pequeña molécula, o porciones de los mismos, etc.) de poder hibridarse, oligomerizarse (por ejemplo, dimerizarse), interactuar o de otro modo formar un complejo entre sí. Por ejemplo, "regiones complementarias de un polipéptido" son capaces de unirse para formar un complejo, que se caracteriza en realizaciones específicas por un haz de dos hélices antiparalelas.

Como se utiliza en el presente documento, el término "complejo" se refiere a un conjunto o agregado de moléculas 35 (por ejemplo, péptidos, polipéptidos, etc.) en contacto directo y/o indirecto entre sí. "Contacto", o más particularmente, "contacto directo" puede significar que dos o más moléculas están lo suficientemente cerca como para que se produzcan interacciones atractivas no covalentes, tales como las fuerzas de Van der Waal, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrófobas, y similares, dominan la interacción de las moléculas. Un complejo de moléculas 40 (por ejemplo, un péptido y un polipéptido) puede formarse en condiciones de tal manera que el complejo se vea favorecido termodinámicamente (por ejemplo, en comparación con un estado no agregado, o no complejo, de las moléculas que lo componen). Como se utiliza en el presente documento el término "complejo", a menos que se describa lo contrario, se refiere al conjunto de dos o más moléculas (por ejemplo, péptidos, polipéptidos o combinaciones de los mismos). El término "complejo" puede referirse al conjunto de tres polipéptidos.

La expresión "biblioteca de compuestos", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier colección 50 de compuestos, que incluye una pluralidad de moléculas de diferente estructura. Las bibliotecas de compuestos pueden incluir bibliotecas químicas combinatorias o bibliotecas de productos naturales. Cualquier tipo de molécula capaz de interactuar, unirse o que tenga afinidad por un polipéptido o complejo químérico de la presente invención, a través de interacciones que incluyen interacciones no covalentes, tales como, por ejemplo, a través de enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, atracciones de van der Waals, o interacciones hidrófobas, pueden estar presentes en la biblioteca de compuestos. Por ejemplo, las bibliotecas de compuestos que abarca esta invención pueden contener moléculas de origen natural, tales como carbohidratos, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, aminoácidos, 55 péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, receptores, ácidos nucleicos, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, incluidos el ADN y los fragmentos de ADN, ARN y fragmentos de ARN y similares, lípidos, retinoides, esteroides, glucopéptidos, glucoproteínas, proteoglicanos y similares; o análogos o derivados de moléculas de origen natural, tales como peptidomiméticos y similares; y moléculas de no origen natural, tales como compuestos orgánicos de "moléculas pequeñas" generados, por ejemplo, utilizando técnicas de química combinatoria; 60 y mezclas de los mismos.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende", se entenderán como que implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por tanto, el uso de la expresión "que comprende" y similares indica que los elementos 65 enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.

- Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sea que siga a la expresión "que consiste en". Por tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que los demás elementos son opcionales y pueden estar o no presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.
- 5 10 Como se utiliza en el presente documento, los términos "conjugado", "unido", "fusionado" o " fusión" y sus equivalentes gramaticales, en el contexto de la unión de dos o más elementos o componentes o dominios por cualquier medio, incluida la conjugación química o los medios recombinantes (por ejemplo, por fusión genética) se utilizan indistintamente. Los métodos de conjugación química (por ejemplo, utilizando agentes de reticulación heterobifuncionales) son conocidos en la técnica. Más específicamente, como se utiliza en el presente documento,
- 15 15 una fusión o conjugado "ectodomínio de proteína de fusión de virus con envoltura" - "fracción estabilizadora de la estructura" se refiere a la conjugación genética o química de un ectodomínio de proteína de fusión de virus con envoltura, que se encuentra convenientemente en una conformación de prefusión metaestable, con una fracción estabilizadora de la estructura. La fracción estabilizadora de la estructura puede fusionarse indirectamente a un ectodomínio de proteína de fusión de virus con envoltura, a través de un enlazador, tal como un enlazador glicina-serina (gly-ser). La fracción estabilizadora de la estructura puede fusionarse directamente con el ectodomínio de una proteína de fusión de virus con envoltura.
- 20 20 25 Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza por un residuo de aminoácidos que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la materia familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que, en general, pueden subclasicarse del siguiente modo:

TABLA 1

SUBCLASIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS	
SUBCLASES	Aminoácido
Ácido	Ácido aspártico, Ácido glutámico
Básico	No cíclico: Arginina, Lisina; Cíclico: Histidina
Cargado	Ácido aspártico, Ácido glutámico, Arginina, Lisina, Histidina
Pequeño	Glicina, Serina, Alanina, Treonina, Prolina
Polar/neutro	Asparagina, Histidina, Glutamina, Cisteína, Serina, Treonina
Polar/grande	Asparagina, Glutamina
Hidrófobo	Tirosina, Valina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Fenilalanina, Triptófano
Aromático	Triptófano, Tirosina, Fenilalanina
Residuos que influyen en la orientación de la cadena	Glicina y prolina

- 30 30 La sustitución de aminoácidos conservadora también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tenga un efecto principal sobre las propiedades del polipéptido variante resultante. Para determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado un polipéptido funcional, basta con evaluar su actividad. En la Tabla 2 se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezado de sustituciones ilustrativas y preferidas. Las sustituciones de aminoácidos que entran dentro del alcance de la invención, se realizan, en general, seleccionando sustituciones que no difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal peptídica en el área de la sustitución, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Después de introducir las sustituciones, se investiga la actividad biológica de las variantes.
- 40 45

TABLA 2

SUSTITUCIONES ILUSTRATIVAS Y PREFERIDAS DE AMINOÁCIDOS		
RESIDUO ORIGINAL	SUSTITUCIONES ILUSTRATIVAS	SUSTITUCIONES PREFERIDAS
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

El término "construcción" se refiere a una molécula genética recombinante que incluye una o más secuencias aisladas de ácido nucleico de diferentes fuentes. Por tanto, las construcciones son moléculas químéricas en las que dos o más

- 5 secuencias de ácido nucleico de origen diferente se ensamblan en una única molécula de ácido nucleico e incluyen cualquier construcción que contenga (1) secuencias de ácido nucleico, incluyendo secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza (es decir, al menos una de las secuencias de nucleótidos es heteróloga con respecto a al menos una de sus otras secuencias de nucleótidos), o (2) secuencias que codifican partes de moléculas de ARN funcionales o proteínas que no están naturalmente contiguas, o (3) partes de promotores
- 10 que no están naturalmente contiguos. Las construcciones representativas incluyen cualquier molécula de ácido nucleico recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica que se replica de forma autónoma, fago o molécula de ácido nucleico lineal o circular de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivada de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de ácido nucleico en la que una o más moléculas de ácido nucleico han sido unidas operativamente. Las construcciones
- 15 de la presente divulgación incluirán generalmente los elementos necesarios para dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés que también está contenida en la construcción, tales como, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana o una secuencia de ácido nucleico moduladora. Dichos elementos pueden incluir elementos de control tales como un promotor que esté operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico de interés (de manera que dirija la transcripción de la misma), y a menudo incluye también una secuencia de poliadenilación. La
- 20 construcción puede estar contenida dentro de un vector. Además de los componentes de la construcción, el vector puede incluir, por ejemplo, uno o más marcadores seleccionables, uno o más orígenes de replicación, tales como los orígenes procarióticos y eucarióticos, al menos un sitio de clonación múltiple, y/o elementos para facilitar la integración estable de la construcción en el genoma de una célula hospedadora. Dos o más construcciones pueden estar contenidas dentro de una única molécula de ácido nucleico, tal como un vector único, o puede estar contenida dentro
- 25 de dos o más moléculas de ácido nucleico separadas, tal como dos o más vectores separados. Una "construcción de expresión" generalmente incluye al menos una secuencia de control operativamente unida a una secuencia nucleotídica de interés. De esta manera, por ejemplo, los promotores en conexión operable con las secuencias de nucleótidos que se van a expresar se proporcionan en construcciones de expresión para la expresión en un organismo o parte de la misma que incluye una célula hospedadora. Para la práctica de la presente invención, las composiciones
- 30 y métodos convencionales para preparar y utilizar construcciones y células hospedadoras son bien conocidos por un experto en la materia, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a edición Volúmenes 1, 2 y 3. J. F. Sambrook, D. W. Russell, y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

- 35 Por "corresponde a" o "correspondiente a" se entiende una secuencia de aminoácidos que muestra una similitud o identidad de secuencia sustancial con una secuencia de aminoácidos de referencia. En general, la secuencia de aminoácidos mostrará al menos aproximadamente un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86,

97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % o incluso hasta un 100 % de similitud o identidad de secuencia con al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de referencia.

5 El término "dominio", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una parte de una molécula o estructura que comparte características fisicoquímicas comunes, tales como, pero sin limitación, dominios hidrófobos, polares, globulares y helicoidales o propiedades tales como la unión a ligandos, fusión de membranas, transducción de señales, penetración celular y similares. Con frecuencia, un dominio tiene una estructura proteica plegada que tiene la capacidad de conservar su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales individuales de las proteínas y, en muchos casos, pueden 10 añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Los dominios pueden ser coextensivos con regiones o porciones del mismo; los dominios también pueden incluir distintas regiones no contiguas de una molécula. Ejemplos de dominios proteicos incluyen, pero sin limitación, un dominio de localización celular o extracelular (por ejemplo, péptido señal; SP), un dominio de inmunoglobulina (Ig), un dominio de fusión de membrana (por ejemplo, péptido de fusión; FP), un ectodomínio, un dominio de región externa proximal de 15 membrana (MPER), un dominio transmembrana (TM) y un dominio citoplásmico (C).

Por "cantidad eficaz", en el contexto de provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, o de tratar o impedir una enfermedad o afección, se entiende la administración de una cantidad de agente a un individuo que lo necesite, ya sea en una sola dosis o como parte de 20 una serie, que sea eficaz para esa provocación, tratamiento o prevención. Esta cantidad eficaz variará dependiendo de la salud y la condición física del individuo que se va a tratar, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre dentro de un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos habituales.

25 El término "endógeno" se refiere a un polipéptido o parte del mismo que está presente y/o se expresa de forma natural dentro de un organismo hospedador o de una célula del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de ectodomínio "endógeno" o parte del mismo se refiere a un polipéptido de ectodomínio de una proteína de fusión de envoltura o a una parte de ese ectodomínio que se expresa de forma natural en el virus con envoltura.

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "región HRA endógena" se refiere a una región HRA que está presente en un polipéptido de ectodomínio de Clase I en una posición sustancialmente idéntica a la de la región HRA en la secuencia de aminoácidos de la forma precursora de la proteína de fusión de origen natural. Las posiciones aproximadas de los aminoácidos de las regiones HRA endógenas de ejemplos no limitativos de proteínas de fusión de Clase I se enumeran en la Tabla 3.

TABLA 3
POSICIONES APROXIMADAS DE LAS REGIONES HRA EN PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE CLASE I SELECCIONADAS

Proteína de fusión de Clase I	Región HRA	
	Posición inicio	Posición final
Hemaglutinina (HA) de la gripe A	356	390
HA de la gripe B	383	416
Proteína de fusión (F) del RSV	164	196
F del hMPV	126	169
F del PIV	136	168
F del Sarampión	138	171
Hendra	136	169
F del Nipah	136	169
Glucoproteína (GP) 160 del VIH	539	587
GP del Ébola	557	593
GP de Marburgo	582	598
Proteína de la espícula (S) del SRAS	892	1013
S de MERS	984	1105

40 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "región HRB endógena" se refiere a una región HRB que está presente en un polipéptido de ectodomínio de Clase I en una posición sustancialmente idéntica a la de la región HRB en la secuencia de aminoácidos de la forma precursora de la proteína de fusión de origen natural. Las posiciones aproximadas de los aminoácidos de las regiones HRB endógenas de ejemplos no limitativos de proteínas de fusión

de Clase I se enumeran en la Tabla 4.

TABLA 4

Proteína de fusión de Clase I	Región HRB	
	Posición inicio	Posición final
HA de la gripe A	421	469
HA de la gripe B	436	487
F del RSV	488	524
F del hMPV	456	490
F del PIV	458	493
F del Sarampión	454	493
Hendra	456	487
F del Nipah	456	487
GP160 del VIH	631	667
GP del Ébola	600	635
GP de Marburgo	611	627
S del SARS	1145	1187
S de MERS	1248	1291

- 5 La expresión "producción endógena" se refiere a la expresión de un ácido nucleico en un organismo y la producción y/o secreción asociada de un producto de expresión del ácido nucleico en el organismo. El organismo puede ser pluricelular (por ejemplo, un animal vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate tal como un ser humano) y el ácido nucleico se expresa dentro de células o tejidos del organismo multicelular.

10 Como se utiliza en el presente documento, "polipéptido de ectodomínio de fusión de virus con envoltura" se refiere a un polipéptido que contiene una porción expuesta a la superficie del virión de una proteína de fusión de virus con envoltura madura, con o sin el péptido señal, pero carece del dominio transmembrana y de la cola citoplasmática de la proteína de fusión de virus con envoltura de origen natural.

15 El término "epítopo" y la expresión "determinante antigénico" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un antígeno, normalmente un determinante proteico, que es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo (dichos epítopos se denominan a menudo "epítopos de linfocitos B") o de ser presentado por una proteína del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (por ejemplo, Clase I o Clase II) a un receptor de linfocitos T (dichos epítopos se denominan a menudo "epítopos de linfocitos T"). Cuando un epítopo de linfocitos B es un péptido o polipéptido, normalmente comprende tres o más aminoácidos, generalmente al menos 5 y más habitualmente al menos de 8 a 10 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser residuos de aminoácidos adyacentes en la estructura primaria del polipéptido (a menudo denominadas secuencias peptídicas contiguas), o pueden yuxtaponerse espacialmente en la proteína plegada (a menudo denominadas secuencias peptídicas no contiguas). Los epítopos de linfocitos T pueden unirse a moléculas CMH de clase I o CMH de clase II. Normalmente, los epítopos de linfocitos T que se unen al CMH de clase I tienen una longitud de 8 a 11 aminoácidos. Las moléculas de clase II se unen a péptidos que pueden ser de 10 a 30 residuos de longitud o más, siendo la longitud óptima de 12 a 16 residuos. La capacidad de un epítopo putativo de linfocitos T para unirse a una molécula del CMH puede predecirse y confirmarse experimentalmente (Dimitrov et al., 2010. *Bioinformatics* 26(16):2066-8).

20

25

30 La expresión "haz de hélices" se refiere a una pluralidad de hélices peptídicas que se pliegan de tal manera que las hélices son sustancialmente paralelas o antiparalelas entre sí. Un haz de dos hélices tiene dos hélices plegadas de tal manera que son sustancialmente paralelas o antiparalelas entre sí. Análogamente, un haz de seis hélices tiene seis hélices plegadas de tal manera que son sustancialmente paralelas o antiparalelas entre sí. Por "sustancialmente paralelas o antiparalelas" se entiende que las hélices están plegadas de tal manera que las cadenas laterales de las hélices pueden interactuar entre sí. Por ejemplo, las cadenas laterales hidrófobas de las hélices son capaces de interactuar entre sí para formar un núcleo hidrófobo.

35

40 El término "heterólogo" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier fracción proteica cuya secuencia se elige de tal manera que el producto de la fusión de esta secuencia con un polipéptido de ectodomínio tiene una secuencia diferente de una forma precursora o madura de una proteína de fusión de virus con envoltura de tipo silvestre.

- El término "hospedador" se refiere a cualquier organismo o célula del mismo, ya sean eucariotas o procariotas en los que se pueda introducir una construcción de la invención, particularmente, hospedadores en los que se produce el silenciamiento del ARN. El término "hospedador" puede referirse a los eucariotas, incluidos los eucariotas unicelulares tales como levaduras y hongos así como los eucariotas multicelulares tales como ejemplos no limitativos de animales de los cuales incluyen animales invertebrados (por ejemplo, insectos, cnidarios, equinodermos, nematodos, etc.); parásitos eucariotas (por ejemplo, parásitos de la malaria, tales como *Plasmodium falciparum*, helmintos, etc.); animales vertebrados (por ejemplos, peces, anfibio, reptil, ave, mamífero); y mamíferos (por ejemplo, roedores, primates tales como los humanos y primates no humanos). Por tanto, el término "célula hospedadora" abarca adecuadamente las células de dichos eucariotas, así como las líneas celulares derivadas de las mismas.
- En el presente documento, la referencia a "inmunointeractiva" incluye la referencia a cualquier interacción, reacción u otra forma de asociación entre moléculas y en particular donde una de las moléculas está, o imita, un componente del sistema inmunitario.
- Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "composición inmunogénica" o "formulación inmunogénica" se refieren a un preparado que, cuando se administra a un vertebrado, especialmente un animal tal como un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria.
- Por "enlazador" se entiende una molécula o grupo de moléculas (tales como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y a menudo sirve para colocar las dos moléculas en una configuración deseable.
- Como se utiliza en el presente documento, el término "metaestable", como se utiliza en el contexto de una proteína (por ejemplo, un polipéptido de ectodominio de virus con envoltura), se refiere a un estado conformacional lábil que se convierte rápidamente en un estado conformacional más estable al cambiar las condiciones. Por ejemplo, una proteína de fusión de virus con envoltura en forma de prefusión se encuentra en una conformación metaestable lábil, y se convierte en la conformación posfusión más estable, por ejemplo, fusión con una célula hospedadora.
- Como se utiliza en el presente documento, el término "fracción" se refiere a una porción de una molécula, que puede ser un grupo funcional, un conjunto de grupos funcionales y/o un grupo específico de átomos dentro de una molécula, que es responsable de una característica propiedad química, biológica y/o medicinal de la molécula.
- La expresión "molécula neutralizante de unión a antígeno" se refiere a una molécula de unión a antígeno que se une o interactúa con una molécula diana o ligando e impide la unión o asociación del antígeno diana a un compañero de unión tal como un receptor o sustrato, interrumpiendo de este modo la respuesta biológica que de otro modo resultaría de la interacción de las moléculas. En el caso de la presente invención, una molécula neutralizante de unión a antígeno se asocia adecuadamente con una forma metaestable o de prefusión de una proteína de fusión de un virus con envoltura y, preferentemente, interfiere o reduce la unión y/o fusión de la proteína de fusión a una membrana celular.
- El término "oligómero" se refiere a una molécula que consiste en más de una unidad de monómero, pero en un número limitado, en contraste con un polímero que, al menos en principio, consiste en un número ilimitado de monómeros. Los oligómeros incluyen, pero sin limitación, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros y similares. Un oligómero puede ser un complejo macromolecular formado por la unión no covalente de macromoléculas como las proteínas. En este sentido, un homooligómero estaría formado por moléculas idénticas y por contraste, un heterooligómero estaría formado por al menos dos moléculas diferentes. Un oligómero puede ser un complejo polipeptídico trimérico que consiste en tres subunidades polipeptídicas. El polipéptido trimérico puede ser un "complejo polipeptídico homotrimérico" que consiste en tres subunidades polipeptídicas idénticas, o un "complejo polipeptídico heterotrimérico" que consiste en tres subunidades polipeptídicas en las que al menos un polipéptido de la subunidad no es idéntico. Una "subunidad polipeptídica" es una cadena de un solo aminoácido o monómero que junto con otras dos subunidades polipeptídicas forma un complejo polipeptídico trimérico.
- La expresión "operativamente conectado" o "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite actuar en su manera prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) "operativamente unida" a una secuencia nucleotídica de interés (por ejemplo, una secuencia codificante y/o no codificante) se refiere al posicionamiento y/u orientación de la secuencia de control en relación con la secuencia nucleotídica de interés para permitir la expresión de dicha secuencia en condiciones compatibles con la secuencia de control. No es necesario que las secuencias de control sean contiguas a la secuencia de nucleótidos de interés, siempre y cuando funcionen para dirigir su expresión. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presente secuencias no codificantes intermedias (por ejemplo, secuencias sin traducir, pero transcritas) entre un promotor y una secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "operativamente unida" a la secuencia de codificación. Análogamente, "conectar operativamente" un polipéptido de ectodominio de fusión de virus con envoltura a una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga abarca el posicionamiento y/o la orientación de la fracción estabilizadora de la estructura de tal manera que se permita que las regiones complementarias HR1 y HR2 se asocien entre sí en condiciones adecuadas para su asociación (por ejemplo, en solución acuosa) para formar un haz de dos hélices antiparalelas.
- Los términos "paciente", "sujeto", "hospedador" o "individuo" utilizados indistintamente en el presente documento, se

refieren a cualquier sujeto, particularmente un vertebrado, y aún más particularmente un mamífero, para los que se desea terapia o profilaxis. Los animales vertebrados adecuados incluyen, pero no se restringen a, cualquier miembro del subfilo Chordata, incluidos los primates (por ejemplo, seres humanos, monos y simios, e incluye especies de monos tales como del género *Macaca* (por ejemplo, monos cynomologus tales como *Macaca fascicularis*, y/o monos rhesus (*Macaca mulatta*)) y babuino (*Papio ursinus*), así como titíes (especies del género *Callithrix*), monos ardilla (especies del género *Saimiri*) y tamarinos (especies del género *Saguinus*), así como especies de simios tales como los chimpancés (*Pan troglodytes*), roedores (por ejemplo, ratones ratas, cobayas), lagomorfos (por ejemplo., conejos, liebres), bovinos (por ejemplo, ganado vacuno), ovinos (por ejemplo, ovejas), caprinos (por ejemplo, cabras), porcinos (por ejemplo., cerdos), equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), aviares (por ejemplo., pollos, pavos, patos, gansos, aves de compañía tales como los canarios, periquitos etc.), mamíferos marinos (por ejemplo, delfines, ballenas), reptiles (serpientes, ranas, lagartos etc.), y peces. Un sujeto preferido es un ser humano que necesite provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o a un complejo de la proteína de fusión. Sin embargo, se entenderá que los términos y expresiones anteriormente mencionados no implican que los síntomas estén presentes.

15 Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia encapsulante que pueda utilizarse con seguridad en la administración tópica o sistémica a un animal, preferentemente un mamífero, incluido los seres humanos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables representativos incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes 20 antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgragantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como sabría un experto en la materia (véase, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier excipiente convencional sea incompatible con el 25 principio o principios activos, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

El término "polinucleótido" o la expresión "ácido nucleico" como se utiliza en el presente documento designa el ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. Normalmente, el término o expresión se refiere a formas poliméricas de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de 30 nucleótido. El término o expresión incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

"Polipéptido", "péptido", "proteína" y "molécula proteica" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a las moléculas que comprenden o consisten en un polímero de residuos de aminoácidos y a las variantes y 35 análogos sintéticos de las mismas. Por tanto, estos términos o expresiones se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos de no origen natural, tal como un análogo químico de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conformación posfusión" de una proteína de fusión de un virus con envoltura se refiere a la estructura de una proteína de fusión de un virus con envoltura, que se encuentra en 40 una conformación terminal (es decir, se forma al final del proceso de fusión) y es el estado energéticamente más favorable. En la conformación posfusión, los péptidos de fusión o los bucles de la proteína de fusión se acercan al dominio transmembrana de la proteína de fusión. Los elementos estructurales específicos que facilitan la formación de la estructura en horquilla varían de acuerdo con la clase de proteína de fusión de envoltura. Por ejemplo, la conformación posfusión de una proteína de fusión de Clase I se caracteriza por la interacción entre la región HRA 45 endógena y la región HRB endógena de proteínas de fusión de Clase I individuales para formar una estructura en horquilla caracterizada por un haz de seis hélices, que comprende tres regiones endógenas HRB y tres regiones endógenas HRA. Como alternativa, la conformación posfusión de una proteína de fusión de Clase III se caracteriza por la interacción entre los bucles de fusión internos y la región transmembrana C-terminal, lo que facilita la formación 50 de una estructura en horquilla. Las conformaciones posfusión de proteínas de fusión virales individuales se han determinado mediante microscopía electrónica y/o cristalografía de rayos X, dichas estructuras son fácilmente identificables cuando se observan en micrografías electrónicas teñidas negativamente y/o por la ausencia de epitopos de prefusión.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conformación de prefusión" de una proteína de fusión de un virus con envoltura se refiere a la estructura de una proteína de fusión de virus con envoltura, que se encuentra en 55 una conformación metaestable (es decir, en una conformación semiestable que no es la conformación terminal energéticamente más favorable) y que, tras un desencadenamiento adecuado, es capaz de experimentar un reordenamiento conformacional hasta la conformación terminal posfusión. Normalmente, las conformaciones de prefusión de las proteínas de fusión virales contienen una secuencia hidrófoba, denominada péptido o bucle de fusión, 60 que se encuentra internamente dentro de la conformación de prefusión y no puede interactuar ni con la membrana de la célula viral ni con la de la célula hospedadora. Al desencadenarse, esta secuencia hidrófoba se inserta en la membrana de la célula hospedadora y la proteína de fusión se colapsa en una conformación similar a una horquilla posfusión. La conformación prefusión de las proteínas de fusión virales varía de acuerdo con la clase de proteína de fusión de envoltura. Cada clase se caracteriza por elementos estructurales que no interactúan y que posteriormente 65 se asocian en la conformación energéticamente favorable posfusión. Por ejemplo, la conformación prefusión de una proteína de fusión de clase I depende de que la región HRA endógena no interactúe con la región HRB endógena de

- las proteínas de fusión individuales del trímero, de este modo no permite la formación de una estructura en horquilla caracterizada por un haz de seis hélices. Como alternativa, la conformación prefusión de una proteína de fusión de Clase III depende de una superhélice central α -helicoidal que no interactúa con el bucle o bucles de fusión en la región C-terminal de las proteínas de fusión individuales del trímero, de este modo no permite la formación de una estructura en horquilla. Las conformaciones prefusión de proteínas de fusión virales individuales se han determinado mediante microscopía electrónica y/o cristalografía de rayos X, dichas estructuras son fácilmente identificables cuando se observan en micrografías electrónicas teñidas negativamente y/o por epítopos de prefusión que no están presentes en las conformaciones de posfusión.
- 5 "Elementos reguladores", "secuencias reguladoras", "elementos de control", "secuencias de control" y similares se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a las secuencias de nucleótidos situadas aguas arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro o aguas abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la traducción de la secuencia codificante asociada, ya sea directa o indirectamente. Los elementos reguladores incluyen potenciadores, promotores, secuencias líder de traducción, intrones, elemento de reconocimiento Rep, regiones intergénicas y secuencias señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales.
- 10 El término "replicón" se refiere a cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, un cromosoma, un virus, un cósmido, etc., que se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótido en una célula, es decir, capaz de replicarse bajo su propio control.
- 15 El "autoensamblaje" se refiere a un proceso de ensamblaje espontáneo de una estructura de orden superior que depende de la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (por ejemplo, moléculas) entre sí. Normalmente se produce a través de movimientos aleatorios de las moléculas y de la formación de enlaces en función del tamaño, la forma, la composición o las propiedades químicas.
- 20 La expresión "identidad de secuencia", como se utiliza en el presente documento, se refiere al grado en que las secuencias son idénticas nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido durante la ventana de comparación. Por tanto, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima durante la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se produce en ambas secuencias, para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. En el presente documento se contempla el uso de polipéptidos de IL-22 de longitud completa, así como de sus fragmentos biológicamente activos. Normalmente, los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido IL-22 de longitud completa pueden participar en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular.
- 25 30 35 40 45 50 55 60 65 "Similitud" se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras como se definen en las Tablas 1 y 2 *supra*. La similitud puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Devereux et al. 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 387-395). De esta manera, las secuencias que tienen una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento podrían compararse mediante la inserción de huecos en la alineación, determinándose dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por GAP.
- Las expresiones utilizadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es de al menos 12, pero frecuentemente entre 15 y 18, y a menudo al menos 25 unidades monoméricas, incluidos los nucleótidos y los residuos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que sea similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos, se realizan normalmente comparando las secuencias de los dos polipéptidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más normalmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en donde una vez alineadas las dos secuencias de manera óptima, se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas. La ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o inferior en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni delecciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA del paquete del programa informático Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o por inspección y la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera

de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como, por ejemplo, la divulgada por Altschul et al., 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. En la unidad 19.3 de Ausubel et al. se puede encontrar una discusión detallada del análisis de secuencias, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, el término "monocatenario" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos.
- 10 Como se utiliza en el presente documento una "molécula pequeña" se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de 3 kilodaltons (kDa), y normalmente menos de 1,5 kilodaltons, y más preferentemente menos de aproximadamente 1 kilodalton. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Como apreciarán los expertos en la materia, basado en la presente descripción, se pueden cribar amplias bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo extractos fúngicos, bacterianos o de algas, con cualquiera de los ensayos de la invención para identificar compuestos que modulen una bioactividad. Una "molécula orgánica pequeña" es un compuesto orgánico (o compuesto orgánico en complejo con un compuesto inorgánico (por ejemplo, metal)) que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 3 kilodaltons, menos de 1,5 kilodaltons o incluso menos de aproximadamente 1 kDa.
- 15 20 Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo referente a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en lo referente a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se utiliza en el presente documento, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a la enfermedad, pero al que aún no se le haya diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.
- 25 30 La expresión "tipo silvestre", "nativo" y "de origen natural" se utilizan en el presente documento indistintamente para referirse a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen o producto génico tipo silvestre, nativo o de origen natural (por ejemplo, un polipéptido) es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen o producto génico.
- 35 Cada realización descrita en el presente documento debe aplicarse *mutatis mutandis* a todas y cada una de las realizaciones salvo que se indique específicamente lo contrario.

2. Polipéptidos químéricos

- 40 La presente invención se basa en parte en una estrategia novedosa para estabilizar artificialmente o "sujetar" un polipéptido de ectodominio de proteína de fusión de virus con envoltura en una conformación prefusión. Esta estrategia de "pinza molecular" emplea la fusión o unión de una fracción estabilizadora de la estructura a un polipéptido de ectodominio para formar un polipéptido químérico. La fracción estabilizadora de la estructura es normalmente un polipéptido monocatenario que comprende repeticiones en héptada complementarias que carecen de complementariedad con el polipéptido de ectodominio y que, por lo tanto, se asocian preferentemente entre sí en lugar de con elementos estructurales del polipéptido de ectodominio. La asociación de las repeticiones en héptada complementarias entre sí en condiciones adecuadas para su asociación (por ejemplo, en solución acuosa) da lugar a la formación de un haz de dos hélices antiparalelas que inhibe el reordenamiento del polipéptido de ectodominio a una conformación posfusión. El haz de dos hélices de la fracción estabilizadora de la estructura puede trimerizarse para formar un haz de seis hélices altamente estable, permitiendo así el autoensamblaje del polipéptido químérico para formar un complejo artificial de proteínas de fusión de virus con envoltura. El complejo así ensamblado puede imitar la conformación prefusión de un complejo nativo de proteínas de fusión de virus con envoltura y comprende tres polipéptidos químéricos, caracterizado por un haz de seis hélices formado por las estructuras superhélice de las respectivas moléculas estabilizadoras de la estructura de los polipéptidos químéricos.
- 45 55 55 2.1 Fracciones estabilizadoras de la estructura

Los presentes inventores han construido una fracción polipeptídica monocatenaria que comprende repeticiones en héptada complementarias que se pliegan en una configuración antiparalela, formando un haz de dos hélices antiparalelas que estabiliza un polipéptido de ectodominio de virus con envoltura operativamente conectado en una conformación de prefusión. El haz de dos hélices forma adecuadamente una estructura superhélice. El pliegue superhélice se da en una gran diversidad de proteínas, incluidas las proteínas motoras, proteínas de unión al ADN, proteínas extracelulares y proteínas de fusión viral (véase, por ejemplo, Burkhard et al., 2001, *Trends Cell Biol.* 11:82-88). Las superhélices se han caracterizado funcionalmente como motivos de plegamiento (ensamblaje, oligomerización), es decir, la formación de una estructura superhélice conduce en muchos casos a la asociación no covalente de diferentes cadenas proteicas. Las superhélices se han caracterizado estructuralmente como ensamblajes

de 2, 3, 4 o 5 hebras de hélices α dispuestas en topologías paralelas, antiparalelas o mixtas (véase, por ejemplo, Lupas, 1996. *Trends Biochem Sci* 21:375-382). Habitualmente, las hélices están ligeramente envueltas (enrolladas, enroscada) una alrededor de la otra de forma levógira o dextrógora, denominado superenrollamiento. Se entenderá que los haces de dos hélices de la presente invención generalmente forman estructuras superhélices con una fuerte propensión a trimerizarse para formar un haz de superhélice de seis hélices altamente estable.

2.1.1 Repeticiones en héptada

- Las superhélices alfa-helicoidales se han caracterizado a nivel de sus secuencias de aminoácidos, en que, cada hélice está constituida por una serie de repeticiones en héptada. Una repetición en héptada (unidad héptada, héptada) es un motivo de secuencia de 7 residuos que puede codificarse como hpphппп, y en donde cada "h" representa un residuo hidrófobo y cada "p" es un residuo polar. Ocasionalmente, se observan residuos p en posiciones h, y viceversa. Una repetición en héptada también suele codificarse mediante los patrones a-b-c-d-e-f-g (abcdefg) o d-e-f -g-a-b-c (defgabc), en cuyo caso los índices "a" a "g" se refieren a las posiciones convencionales de la héptada en las que se observan normalmente los tipos de aminoácidos. Por convención, los índices "a" y "d" indican las posiciones de los residuos del núcleo (residuos centrales y enterrados) en una superhélice. Los tipos típicos de aminoácidos que se observan en las posiciones a y d del núcleo son tipos de residuos de aminoácidos hidrófobos; en todas las demás posiciones (posiciones no esenciales), se observan tipos de residuos predominantemente polares (hidrófilos). Por tanto, los patrones de héptada convencionales 'hпппп' coinciden con la notación de patrón 'abcdefg' (los patrones 'hппппп' coinciden con la notación de patrón 'defgabc'), esta notación se utiliza para las superhélices que comienzan con un residuo hidrófobo en una posición d). Las regiones de repetición en héptada de la presente invención incluyen al menos 2, y adecuadamente 3 o más repeticiones en héptada consecutivas (ininterrumpidas) en hélices α individuales de la estructura superhélice. Cada serie de repeticiones en héptada consecutivas en una hélice se denomina "secuencia de repetición en héptada" (HRS). El inicio y el extremo de una secuencia de repetición en héptada se determina preferentemente a partir de la estructura tridimensional (3-D) determinada experimentalmente, si está disponible. Si no se dispone de una estructura 3-D, el inicio y el extremo de una secuencia de repetición en héptada se determina preferentemente sobre la base de una superposición óptima de un patrón (hппппп)_n o (hппппп)_n con la secuencia de aminoácidos real, donde "h" y "p" indican residuos hidrófobos y polares, respectivamente, y donde "n" es un número igual o superior a 2. Se considera que el inicio y el final de cada secuencia de repetición en héptada son el primer y el último residuo hidrófobo en posición a o d, respectivamente. Los residuos H convencionales se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, glutamina, treonina, serina y alanina, más preferentemente del grupo que consiste en valina, isoleucina, leucina y metionina, y lo más preferentemente isoleucina. Los residuos p convencionales se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en glicina, alanina, cisteína, serina, treonina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, lisina y arginina. En caso de que este método no permita la asignación inequívoca de residuos de aminoácidos a una secuencia repetida en héptada, puede aplicarse un método de análisis más especializado, tal como el método COILS de Lupas et al. (1991. *Science* 252:1162-1164; <http://www.russell.embl-heidelberg.de/cgi-bin/coils-svr.pl>).
- En realizaciones particulares, cada región de repetición en héptada (HR1, HR2) se caracteriza independientemente por un patrón de 7 residuos de tipos de aminoácidos n veces repetidos, representado como (a-b-c-d-e-f-g-_n) o (d-e-f-g-a-b-c-_n), como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2010/066740, en donde los elementos del patrón "a" a "g" indican posiciones convencionales de la héptada en las que se localizan los tipos de aminoácidos y n es un número igual o mayor de 2, y al menos el 50 % (o al menos del 51 % al 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales de la héptada "a" y "d" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófobos y al menos el 50 % (o al menos del 51 % al 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales de la héptada "b", "c", "e", "f" y "g" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófilos, la distribución resultante entre los tipos de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos permite identificar las regiones de repetición en héptada. Al menos el 50 %, 70 %, 90 %, o 100 % de las posiciones convencionales de la héptada "a" y "d" pueden estar ocupadas por aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en valina, isoleucina, leucina, metionina o derivados de las mismas no naturales. Puesto que estos últimos aminoácidos corresponden a residuos más convencionales (observados con mayor frecuencia) del núcleo de la superhélice. Al menos el 50 %, 70 %, 90 % o 100 % de las posiciones convencionales de la héptada "a" y "d" pueden estar ocupadas por isoleucinas. Al menos el 50 %, 70 %, 90 %, o 100 % de las posiciones convencionales de la héptada "b", "c", "e", "f" y "g" pueden estar ocupadas por aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina, alanina, cisteína, serina, treonina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, lisina, arginina o derivados de las mismas no naturales. En ejemplos ilustrativos de este tipo, las regiones HR1 y HR2 comprenden o consisten prácticamente en la secuencia: IEEIQKQIAAIQKQIAAIQKQIYRM [SEQ ID NO: 1]
- En realizaciones particulares, las regiones HR1 y HR2 de la fracción estabilizadora de la estructura (también denominadas en el presente documento "SSM") comprenden al menos una repetición en héptada endógena de una proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I. Convenientemente, las regiones HR1 y HR2 están formadas en gran parte por regiones complementarias HRA y HRB, respectivamente, de una o más proteínas de fusión de virus con envoltura de Clase I. La secuencia de aminoácidos de la región HRA y la secuencia de aminoácidos de la región HRB pueden derivarse de la misma proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I. Como alternativa, pueden derivarse de las diferentes proteínas de fusión de virus con envoltura de Clase I. En ejemplos representativos, las

- regiones HR1 y HR2 se seleccionan independientemente de las regiones HRA y HRB de los ortomixovirus (por ejemplo, gripe A (Inf A), gripe B (Inf B), gripe C (Inf C)), paramixovirus (por ejemplo, sarampión (MeV), virus de la peste bovina (RPV), virus del moquillo canino (CDV), RSV, metapneumovirus humano (HMPV), virus de la parainfluenza (PIV), virus de la parotiditis (MuV), virus Hendra (HeV), virus Nipah (NiV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), retrovirus (por ejemplo, virus de la leucemia de linfocitos T humanos tipo 1 (HTLV-1), HTLV-2, HTLV-3, VIH-1, VIH-2), filovirus (por ejemplo., virus del Ébola (EBOV) incluido las cepas Zaire (ZEBOV), Reston (REBOV) y Sudán (SEBOV), virus de Marburgo (MARV)), arenavirus (por ejemplo, virus de Lassa (LASV), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Junín (JUNV)), y coronavirus (por ejemplos, Coronavirus humano (HCoV), incluido el HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV HKU1, HCoV EMC, torovirus humano (HToV), virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)).

Las secuencias de aminoácidos de la región HRA ilustrativas incluyen, pero sin limitación, las de la Tabla 5:

TABLA 5

SECUENCIAS DE LA REGIÓN HRA DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE CLASE I SELECCIONADAS	
VIRUS	SECUENCIA DE LA REGIÓN HRA
GP160 del VIH	SGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILA [SEQ ID NO: 2] (GenPept dbiBAF31430.1)
F del RSV	LHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLGNGVSVLTSKVLDLK [SEQ ID NO: 3] (GenPept gbAHL84194.1)
F del HMPV	IRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNQVRVLATAVRELK [SEQ ID NO: 4] (GenPept gbAAN52913.1)
F del PIV	KQARSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKSVQ [SEQ ID NO: 5] (GenPept gbAAB21447.1)
F del MeV	MLNSQAIDNLRASLETTNQAIEAIRQAGQEMILAVQGVQ [SEQ ID NO: 6] (GenPept dbjBAB60865.1)
F del HeV	MKNADNINKLKSIIESTNEAVVQLQETAEKTVYVLTALQ [SEQ ID NO: 7] (GenPept NP_047111.2)
HA de la Inf A	ENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAI [SEQ ID NO: 8] (GenPept gbAEC23340.1)
HA de la Inf B	HGYTSHGAHGGVAVAADLKSTQEAINKITKLNLYL [SEQ ID NO: 9] (GenPept gbAFH57854.1)
GP del EBOV	GLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFL [SEQ ID NO: 10] (GenPept NP_066246.1)
GP del MARV	LANQTAKSLELLLRTVTTEERTFSLINRHAIDFLLTRWG [SEQ ID NO: 11] (GenPept YP_001531156.1)
S de MERS	ISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTLNAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVNE [SEQ ID NO: 12] (GenPept gbAHX00711.1)
S del SARS	ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE [SEQ ID NO: 13] (GenPept gbAAR86788.1)

15

Las secuencias de aminoácidos de la región HRB ilustrativas incluyen, pero sin limitación, las de la Tabla 6:

TABLA 6

SECUENCIAS DE LA REGIÓN HRB DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE CLASE I SELECCIONADAS	
VIRUS	SECUENCIA DE LA REGIÓN HRB
GP160 del VIH	HTTWMEWDREINNYTSIHSLSIEESSQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 14] (GenPept dbjBAF31430.1)
F del RSV	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN [SEQ ID NO: 15] (GenPept gbAHL84194.1)
F del HMPV	FNVALDQVFESIENSQALVDQSNSRILSSAEKGNTG [SEQ ID NO: 16] (GenPept gbAAN52913.1)
F del PIV	IELNKAKSDLEESKEWIRRNSNQKLDSIGNWHQSSTT [SEQ ID NO: 17] (GenPept gbAAB21447.1)
F del MeV	LERLDVGTNLGNAIAKLEDAKELLESSDQILRSMKGLSST [SEQ ID NO: 18] (GenPept dbjBAB60865.1)
F del HeV	ISSQISSMNQSLQSKDYIKEAQKILDVNPS [SEQ ID NO: 19] (GenPept NP_047111.2)
HA de la Inf A	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELVLALENQHTIDLTDSEMSKLFERTRR [SEQ ID NO: 20] (GenPept gbAEC23340.1)

(continuación)

SECUENCIAS DE LA REGIÓN HRB DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE CLASE I SELECCIONADAS	
HA de la Inf B	DEILELDEKVDDLRAVTSSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKKML [SEQ ID NO: 21] (GenPept gbAFH57854.1)
GP del EBOV	HDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTL [SEQ ID NO: 22] (GenPept NP_066246.1)
GP del MARV	IGIEDLSKNISEQIDQI [SEQ ID NO: 23] (GenPept YP_001531156.1)
S de MERS	NFGSLTQINTTLLDTYEMLSLQQVKALNESYIDLKELGNYTY [SEQ ID NO: 24] (GenPept gbAHX00711.1)
S del SARS	DVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGK [SEQ ID NO: 25] (GenPept gbAAR86788.1)

Las regiones HR1 y HR2 son capaces de unirse para formar un oligómero, normalmente un hexámero compuesto por tres regiones HR1 y tres regiones HR2, que es termodinámicamente estable y tipifica la conformación posfusión de

5 las proteínas de fusión viral de Clase I. Las regiones HR1 y HR2 con una fuerte propensión a la oligomerización se denominan en el presente documento regiones de repetición en héptada "complementarias". Ejemplos no limitativos de dichas regiones de repetición en héptada son los enumerados en la Tabla 7.

- 10 En realizaciones particulares, la fracción estabilizadora de la estructura, incluyendo una o ambas regiones de repetición en héptada, incluye una fracción inmunosilenciadora o supresora que inhibe la provocación o producción de una respuesta inmunitaria a la fracción estabilizadora de la estructura, particularmente cuando se pliega en un haz de dos hélices antiparalelas. Estas realizaciones son ventajosas ya que pueden permitir la generación de una respuesta inmunitaria más fuerte o mejorada al polipéptido de ectodominio o complejo del mismo. La fracción inmunosilenciadora puede ser un sitio de glucosilación específicamente reconocido y glucosilado por una enzima de
- 15 glucosilación, en particular una glucosiltransferasa. Las glucosilaciones pueden ser ligadas a N o ligadas a O. Ligada a N se refiere a la unión de la fracción de hidrato de carbono con la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptidas N-X-S y N-X-T, donde X es cualquier aminoácido excepto P, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de hidratos de carbono a la cadena lateral de asparagina, y estas secuencias se denominan comúnmente "sitios de glucosilación". La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más frecuentemente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La fracción inmunosilenciadora puede insertarse en la fracción estabilizadora de la estructura, incluyendo una o ambas regiones de repetición en héptada.
- 20
- 25 En otras realizaciones, pueden incorporarse aminoácidos no naturales o no nativos en una o ambas de las regiones de repetición en héptada utilizando un código genético expandido. Los aminoácidos no nativos se incorporan biosintéticamente en la localización deseada utilizando el par ortogonal tiroxil-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa y un codón sin sentido en el sitio deseado. Los aminoácidos no nativos o no naturales se suministran a las células que expresan una construcción a partir de la cual es expresable el polipéptido químérico, a partir de una fuente externa y esta estrategia puede incorporar cadenas laterales con una amplia gama de atributos físicos que incluyen, pero sin limitación, grupo químico reticulante (por ejemplo, azida o haloalcano), un marcador rastreable (por ejemplo, fluorescente o radiactivo) y grupos fotosensibles para permitir modificaciones controladas temporalmente. A estos aminoácidos no naturales se les pueden unir covalentemente diversas fracciones mediante adición química a la fracción estabilizadora de la estructura para proporcionarles propiedades ventajosas.

TABLA 7
SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS DE LA REGIÓN DE REPETICIÓN EN HÉPTADA

VIRUS	SECUENCIA DE LA REGIÓN HR1	SECUENCIA DE LA REGIÓN HR2
Sintético	IEEIQKQAAIIOKQIAIIOKQYRM [SEQ ID NO: 26]	IEEIQKQAAIIOKQIAIIOKQYRM [SEQ ID NO: 27]
a		
GP160 det VIH	SGIVQQONNLRAIEAQOHLLQLTVWGSIKQLQARILA [SEQ ID NO: 28] (GenPept dbIBAF31430.1)	HTTWMEWDREINNYTSIHSLEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 29] (GenPept dbIBAF31430.1)
F del RSV	LHLEGEVNIKIKSALLSTNKAIVSLGNGVSYLTSKVLDLK [SEQ ID NO: 30] (GenPept qbAHL84194.1)	FDASSQVNNEKINOSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN [SEQ ID NO: 31] (GenPept qbAHL84194.1)
F del IMPV	IRLESEVTAIKNALKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELK [SEQ ID NO: 32] (GenPept qbAAN52913.1)	FNVALDOVFESIENSQALVQDSNRLSSAEKGNTG [SEQ ID NO: 33] (GenPept qbAAN52913.1)
F del PIV	KOARSDEIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLVAIKSVQ [SEQ ID NO: 34] (GenPept qbAAB21447.1)	IELNNAKAKSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQSSTT [SEQ ID NO: 35] (GenPept qbAAB21447.1)
F del MeV	MLNSQADDNLRASLETTNGQAEIAIROAQEMILAVQGVQ [SEQ ID NO: 36] dbIBA860865.1	LERLDVGNTNLGNNAIAKLEDAKELLESSDQILRSMWGLSST [SEQ ID NO: 37] (GenPept dbIBA860865.1)
F del B-eV	MKNADNNINKLSSIESITNEAVVKLOETAEKTVVYLTAQ [SEQ ID NO: 38] (GenPept NP_047111.2)	ISSQISSMNOSLQOSKSDYIKEAQKILDIVNPS [SEQ ID NO: 39] (GenPept NP_047111.2)
HA de la Inf A	ENGWEGMIVDGWYGFRRHONSEGTTGQAIDLKSTQAA [SEQ ID NO: 40] (GenPept qbAEC23340.1)	RIGDIEKYVEDTKIDLWSYNAELVIALENQHTIDLTDSEMSKLFERTR R [SEQ ID NO: 41] (GenPept qbAEC23340.1)
HA de la Inf B	HGY1SHGGAHGGVAVAADLKSTQEANKITKNLYL [SEQ ID NO: 42] (GenPept qbAFH57854.1)	DEELLEDEKVDDLRADTTISQIELAVL3.SNEGIIINSEDEHLLALERKK ML [SEQ ID NO: 43] (GenPept qbAFH57854.1)
GP del EBOV	GLROLANETTQQUALQFLRATTETRTFSILNRKAIDFL [SEQ ID NO: 44] (GenPept NP_066246.1)	HDWTKNITTDKIDQIHDVFVDKTL [SEQ ID NO: 45] (GenPept NP 066246.1)
GP del MARV	LANQTAKSLELLIRVTEETERTFSLNRHAIDFLTRW [SEQ ID NO: 46] (GenPept YP_001531156.1)	IGIEDLSKNISEQIDQI [SEQ ID NO: 47] (GenPept YP_001531156.1)
S de MERS	ISASIGDIQRLDVLEQDAQIDRDRJINGRLTTLNAFVAQQLVRSESALSAQAKDK V NEG [SEQ ID NO: 48] (GenPept qbAHX00711.1)	GSGCGNFGSLTQINTTLLDLTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYTY [SEQ ID NO: 49] (GenPept qbAHX00711.1)
S del SARS	ISSVVLNDLSRLDKVKEAEVQIDRLLTGRLQSLQTYVTQQURAAEIRASANLAATK MS EG [SEQ ID NO: 50] (GenPept qbAAR86788.1)	GSGGGDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLLNEVAKNLNESLLELQELGK [SEQ ID NO: 51] (GenPept qbAAR86788.1)

Cualquier combinación posible de los ejemplos anteriores, o una adición química no natural adicional, puede estar unida covalentemente a la fracción estabilizadora de la estructura.

- 5 Opcionalmente, pueden insertarse adicionalmente uno o más residuos de cisteína en las regiones HR1 y/o HR2 para formar enlaces disulfuro y estabilizar aún más la estructura superhélice α -helicoidal antiparalela de la fracción estabilizadora de la estructura.

2.1.2 Enlazadores

- 10 La fracción estabilizadora de la estructura de la presente invención comprende adecuadamente un enlazador que espacia las regiones de repetición en héptada (también se denominan en el presente documento HR1 y HR2). El enlazador incluye generalmente cualquier residuo de aminoácidos que no pueda ser asignado sin ambigüedad a una secuencia de repetición en héptada. Los enlazadores se utilizan con frecuencia en el campo de la ingeniería de proteínas para interconectar diferentes unidades funcionales, por ejemplo, en la creación de construcciones de fragmentos variables monocatenarios (scFv) derivados de las cadenas ligeras variables (VL) y pesadas (VH) variables de anticuerpos. Generalmente, son conformacionalmente flexibles en solución y están compuestos adecuada y predominantemente por tipos de residuos de aminoácidos polares. Los aminoácidos típicos (utilizados frecuentemente) en los enlazadores flexibles son la serina y la glicina. Menos preferentemente, los enlazadores flexibles también pueden incluir alanina, treonina y prolina. Por tanto, un enlazador intermedio de la fracción estabilizadora de la estructura es preferentemente flexible en su conformación para asegurar la asociación relajada (sin obstáculos) de HR1 y HR2 como haz de dos hélices que adopta adecuadamente una estructura superhélice α -helicoidal. Los enlazadores adecuados para su uso en los polipéptidos previstos en el presente documento estarán claros para el experto, y pueden ser generalmente cualquier enlazador utilizado en la técnica para enlazar secuencias de aminoácidos, siempre que los enlazadores sean estructuralmente flexibles, en el sentido de que permiten, y convenientemente no perjudican, el ensamblaje de la estructura característica de haz de dos hélices de la fracción estabilizadora de la estructura.

- 30 El experto será capaz de determinar los enlazadores óptimos, opcionalmente tras realizar un número limitado de experimentos rutinarios. El enlazador intermedio es convenientemente una secuencia de aminoácidos que consiste generalmente en al menos 1 residuo de aminoácido y suele consistir en al menos 2 residuos de aminoácidos, con un límite superior no crítico elegido por comodidad de uso de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos. En realizaciones particulares, el enlazador consiste en de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos. El enlazador puede habitualmente consistir en de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, normalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos. En ejemplos no limitativos, el enlazador tiene aproximadamente el mismo número de aminoácidos que el número de aminoácidos que conectan las regiones complementarias HRA y HRB de una proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I. En particular, al menos el 50 % de los residuos de aminoácidos de una secuencia enlazadora puede seleccionarse del grupo de prolina, glicina y serina. Al menos el 60 %, tal como al menos el 70 %, tal como, por ejemplo, el 80 % y más particularmente el 90 % de los residuos de aminoácidos de una secuencia enlazadora pueden seleccionarse del grupo de prolina, glicina y serina. Las secuencias enlazadoras pueden consistir prácticamente en residuos de aminoácidos polares; en dichos casos, al menos el 50 %, tal como al menos el 60 %, tal como, por ejemplo, el 70 % o el 80 % y más particularmente el 90 % o hasta el 100 % de los residuos de aminoácidos de una secuencia enlazadora pueden seleccionarse del grupo que consiste en glicina, serina, treonina, alanina, prolina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, lisina y arginina. Las secuencias enlazadoras pueden incluir [GGSG]_nGG, [GGGGS]_n, [GGGGG]_n, [GGGKGGGG]_n, [GGGNNGGG]_n, [GGGCAGGG]_n, en donde n es un número entero de 1 a 10, adecuadamente de 1 a 5, más adecuadamente de 1 a 3.

- 50 En dichos casos en los que las regiones de repetición en héptada comprenden, consisten o consisten prácticamente en regiones HRA y HRB complementarias, respectivamente, de una proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I, el enlazador puede comprender, consistir o consistir prácticamente en una secuencia de aminoácidos de origen natural, que conecta las regiones HRA y HRB. La secuencia intermedia puede ser de longitud completa, o aproximadamente de longitud completa o puede comprender, consistir o consistir prácticamente en una o más porciones de una secuencia de aminoácidos de origen natural intermedia completa. El enlazador puede carecer de una secuencia de aminoácidos de origen natural interpuesta entre las regiones HRA y HRB de una proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I de tipo silvestre. El enlazador puede comprender una o más secuencias de aminoácidos de no origen natural.

- 60 Además de espaciar las regiones de repetición en héptada de la fracción estabilizadora de la estructura y, preferentemente, introducir flexibilidad estructural para facilitar la asociación antiparalela de dichas regiones, el enlazador puede comprender una o más funcionalidades auxiliares. Por ejemplo, el enlazador puede comprender una fracción de purificación que facilite la purificación del polipéptido químérico y/o al menos una fracción inmunomoduladora que module una respuesta inmunitaria al polipéptido químérico.

- 65 Las moléculas de purificación normalmente comprenden un tramo de aminoácidos que permite la recuperación del polipéptido químérico mediante la unión por afinidad. En la técnica se conocen numerosas fracciones de purificación

- o "etiquetas", ejemplos ilustrativos de las cuales incluyen la etiqueta de la proteína portadora de carboxilo de biotina (etiqueta BCCP), etiqueta Myc (etiqueta c-myc), etiqueta de calmodulina, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta His (etiqueta de hexahistidina, His6, 6H), etiqueta de la proteína de unión a maltosa (etiqueta MBP), etiqueta Nus, etiqueta de la proteína de unión a quitina (etiqueta CBP) etiqueta de la glutatión-S-transferasa (etiqueta GST), etiqueta de la proteína fluorescente verde (etiqueta GFP), etiqueta de poliglutamato, etiqueta beta amiloide, etiqueta tiorredoxina, etiqueta S, Softag 1, Softag 3, etiqueta Strep, etiqueta del péptido de unión a estreptavidina (etiqueta SBP), etiqueta de biotina, etiqueta de estreptavidina y etiqueta V5.
- 5 Pueden introducirse fracciones inmunomoduladoras en el enlazador para modular la respuesta inmunitaria provocada por el polipéptido químérico o el complejo del mismo. Ejemplos no limitativos de dichas fracciones incluyen fracciones inmunosilenciadoras o supresoras, como se ha descrito anteriormente, fracciones antigénicas, que incluyen fracciones antigénicas derivadas de organismos patógenos u otras fracciones antigénicas asociadas a enfermedades, tales como 10 antígenos asociados al cáncer o a tumores. Los organismos patógenos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos parásitos, algas, protozoos y amebas. Las fracciones antigénicas pueden derivarse de antígenos 15 de virus patógenos. Virus ilustrativos responsables de enfermedades que incluyen, pero sin limitación, sarampión, paperas, rubéola, poliomielitis, hepatitis A, B (por ejemplo, N.º de acceso de GenBank E02707), y C (por ejemplo, N.º de acceso de GenBank E06890), así como otros virus de la hepatitis, gripe, adenovirus (por ejemplo, tipos 4 y 7), rabia por ejemplo, N.º de acceso de GenBank M34678), fiebre amarilla, virus de Epstein-Barr y otros herpesvirus tales como 20 el virus del papiloma, virus del Ébola, virus de la gripe, encefalitis japonesa (por ejemplo, N.º de acceso de GenBank E07883), dengue (por ejemplo, N.º de acceso de GenBank M24444), hantavirus, virus sendai, virus respiratorio sincicial, ortomixovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus visna, citomegalovirus y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (por ejemplo, N.º de acceso de GenBank U18552). Cualquier antígeno adecuado derivado de dichos virus es útil en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, antígenos retrovirales ilustrativos derivados del VIH 25 incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como productos génicos de los genes *gag*, *pol* y *env*, la proteína Nef, transcriptasa inversa y otros componentes del VIH. Ejemplos ilustrativos de antígenos virales de la hepatitis incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como las proteínas S, M y L del virus de la hepatitis B, el antígeno pre-S del virus de la hepatitis B, y otras hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B, y C. Ejemplos ilustrativos de antígenos virales de la gripe incluyen; pero sin limitación, antígenos tales como la hemaglutinina y la neuraminidasa y otros componentes virales 30 de la gripe. Ejemplos ilustrativos de antígenos virales del sarampión incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como la proteína de fusión del virus del sarampión y otros componentes del virus del sarampión. Ejemplos ilustrativos de antígenos virales de la rubéola incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como las proteínas E1 y E2 y otros componentes del virus de la rubéola; antígenos rotavirales tales como VP7sc y otros componentes rotavirales. Ejemplos ilustrativos de antígenos citomegalovirales incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como la 35 glucoproteína B de la envoltura y otros componentes del antígeno citomegaloviral. Ejemplos no limitativos de antígenos virales sincitiales respiratorios incluyen antígenos tales como la proteína de fusión del RSV, la proteína M2 y otros componentes del antígeno viral sincitial respiratorio. Ejemplos ilustrativos de antígenos virales del herpes simplex incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como las proteínas tempranas inmediatas, glucoproteína D y otros componentes del antígeno viral del herpes simple. Ejemplos no limitativos de antígenos virales de varicela zóster incluyen antígenos tales como 9PI, gpl1 y otros componentes del antígeno viral de la varicela zóster. Ejemplos no 40 limitativos de antígenos virales de la encefalitis japonesa incluyen antígenos tales como las proteínas E, M-E, M-E-NS 1, NS 1, NS 1-NS2A, 80 % E, y otros componentes del antígeno viral de la encefalitis japonesa. Ejemplos representativos de antígenos virales de la rabia incluyen, pero sin limitación, antígenos tales como la glucoproteína de la rabia, nucleoproteína de la rabia y otros componentes del antígeno viral de la rabia. Ejemplos ilustrativos de 45 antígenos del virus del papiloma incluyen, pero sin limitación, las proteínas de la cápside L1 y L2, así como los antígenos E6/E7 asociados a los cánceres cervicales, véase Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M., 1991, Raven Press, Nueva York, para ejemplos adicionales de antígenos virales. El antígeno viral puede ser un antígeno de un virus con envoltura al que corresponda el polipéptido de ectodomio. El antígeno viral puede ser un antígeno de un virus con envoltura diferente al que corresponde el polipéptido de ectodomio.
- 50 En el enlazador pueden insertarse uno o más antígenos asociados al cáncer o a tumores. Dichos antígenos incluyen, pero sin limitación, MAGE-2, MAGE-3, MUC-1, MUC-2, HER-2, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular MAA, GD2, antígeno carcinoembionario (CEA), TAG-72, antígenos asociados al ovario OV-TL3 y MOV 18, TUAN, alfa-fetoproteína (AFP), OFP, CA-125, CA-50, CA-19-9, antígeno asociado al tumor renal G250, EGP-40 (también conocido como EpCAM), S100 (antígeno asociado al melanoma maligno), p53, antígenos asociados a tumores de próstata (por ejemplo, PSA y PSMA), p21ras, Her2/neu, EGFR, EpcAM, VEGFR, FGFR, MUC-I, CA 125, CEA, MAGE, CD20, CD19, CD40, CD33, A3, antígeno específico a los anticuerpos A33, antígeno BrE3, CD1, CD1a, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD21, CD22, CD23, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD45, CD46, CD52, CD54, CD74, CD79a, CD126, CD138, CD154, B7, Ia, II, HML24, HLA-DR (por ejemplo, HLA-DR10), NCA95, NCA90, HCG y subunidades, CEA (CEACAM5), CEACAM-6, CSAp, EGP-I, EGP-2, Ba 733, antígeno KC4, antígeno KS-I, KS1-4, Le-Y, MUC2, MUC3, MUC4, PIGF, fibronectina ED-B, NCA 66a-d, antígeno PAM-4, PSA, PSMA, RS5, SIOO, TAG-72, TIOI, TAG TRAIL-RI, TRAIL-R2, p53, tenascina, factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), antígeno Tn etc.
- 55 60 65 La fracción o fracciones antigénicas incluidas en el enlazador pueden corresponder a antígenos completos o a antígenos parciales. Cuando se emplean antígenos parciales, los antígenos parciales pueden comprender uno o más epítopos de un antígeno de interés, incluyendo epítopos de linfocitos B y/o epítopos de linfocitos T (por ejemplo, epítopos de linfocitos T citotóxicos (CTL) y/o epítopos de linfocitos T auxiliares (Th)). Los epítopos de numerosos

antígenos son conocidos en la bibliografía o pueden determinarse utilizando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la materia. El enlazador puede incluir otra fracción de direccionamiento celular que puede proporcionar la administración a un tipo específico de célula dentro de la persona inmunizada. Las poblaciones celulares de interés incluyen, pero sin limitación, linfocitos B, células de micropliegues y células presentadoras de antígenos (CPA). En este último ejemplo, la fracción dirigida facilita un mayor reconocimiento del polipéptido químérico o del complejo del mismo por una CPA tal como una célula dendrítica o un macrófago. Dichas secuencias dirigidas pueden potenciar la presentación de CPA de epitopos de un polipéptido de ectodominio asociado, que a su vez puede aumentar la respuesta inmunitaria resultante, incluyendo la intensificación o ampliación de la especificidad de una o ambas respuestas inmunitarias celulares y de anticuerpos al polipéptido de ectodominio. Ejemplos no limitativos de fracciones dirigidas a CPA incluyen ligandos que se unen a receptores de superficie de CPA tales como, pero sin limitación, lectina específica de la manosa (receptor de la manosa), receptores de Fc de IgG, DC-SIGN, BDCA3 (CD141), 33D1, SIGLEC-H, DCIR, CD11c, receptores de la proteína de choque térmico y receptores secuestradores. La fracción dirigida a CPA es una fracción dirigida a células dendríticas, que comprende, consiste o consiste prácticamente en la secuencia FYPSYHSTPQRP (Uriel, et al., *J. Immunol.* 2004 172: 7425-7431) o NWYLPWLGTNDW (Sioud, et al., *FASEB J.* 2013 27(8): 3272-83).

2.2 Proteínas de fusión de virus con envoltura y polipéptidos de ectodominio

La estrategia de pinza molecular de la presente invención es útil para estabilizar una serie de polipéptidos de ectodominio cuyos homólogos de tipo silvestre se ensamblan en trímeros en sus formas de prefusión, incluidas las proteínas de fusión de Clase I y Clase III. Las proteínas de fusión de clase I no limitativas incluyen las proteínas de fusión de ortomixovirus (por ejemplo, las proteínas HA de la Inf A, Inf B e Inf C), paramixovirus (por ejemplo, las F y las proteínas del MeV, RPV, CDV, RSV, HMPV, PIV, MuV, HeV, NiV y NDV), retrovirus (por ejemplo, las glucoproteínas de envoltura del HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3, VIH-1, VIH-2), filovirus (por ejemplo, las glucoproteínas del EBOV, ZEBOV, REBOV, SEBOV y MARV), arenavirus (por ejemplo, las glucoproteínas y los péptidos señal estables (SSP) del LASV, LCMV y JUNV) y coronavirus (por ejemplo, las proteínas S del HCoV, HToV, SARS-CoV y MERS-CoV). Las proteínas de fusión representativas de la Clase III incluyen las proteínas de fusión de los rabdovirus (es decir, las glucoproteínas (G) del virus de la rabia (RABV), lyssavirus del murciélagos australiano (ABL), virus de la fiebre efímera bovina (BEFV) y virus de la estomatitis vesicular (VSV)) y herpesvirus (por ejemplo, las glucoproteínas (gB, gD, gH/L) del virus del herpes humano de tipo 1 (HHV-1; también conocido como virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1)), HHV-2 (también conocido como HSV-2), HHV-3 (también conocido como virus de la varicela zóster (VZV)), HHV-4 (también conocido como virus de Epstein Barr (EBV)) y HHV-5 (también conocido como citomegalovirus (CMV)).

El polipéptido de ectodominio puede comprender o consistir en un polipéptido de ectodominio precursor de longitud completa o una porción del mismo. El polipéptido de ectodominio puede carecer de uno o más péptidos señal endógenos, una porción de cabeza endógena de un ectodominio, una porción de tallo endógena de un ectodominio, un dominio endógeno similar a la mucina, una región externa proximal de membrana endógena (MPER) y un péptido de fusión endógeno. Como alternativa, o además, uno o más sitios de escisión proteolítica endógena (por ejemplo, uno o más sitios de escisión por furina) puede alterarse o suprimirse una proteína de fusión de tipo silvestre o de referencia para que el polipéptido de ectodominio se vuelva menos susceptible al corte proteolítico por una proteasa (por ejemplo, una proteasa celular tal como la furina).

Los polipéptidos de ectodominio de la invención pueden construirse con el conocimiento de las ubicaciones de varias fracciones o dominios estructurales y funcionales que están presentes en una proteína de fusión precursora de virus con envoltura de longitud completa. A continuación, se analizan ejemplos no limitativos de dichas proteínas precursoras y sus dominios asociados, con referencia a la construcción de polipéptidos de ectodominio ilustrativos.

2.2.1 HA de la Inf A

Un precursor ilustrativo de HA de la Inf A tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNNDNSTATLCLGHAVPNGTLVKITDDQIEVTNATELVQSSSTGKIC NNPCHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDFVFQNETWDLFVERSKAFCNSCYPDVPDYASLRSLVASSGTLFITEGFTW TGVTQNNGGSNACKRGPGSGFFSRLNWLTKGSTYPVLNVTPNMPNNFDKLYIWGIHHPSTNQEQTSLYVQASG RVTVSTRRSQQTIIPNIGSRPVWRGLSSRISIYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDT 55 CISECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPKEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMIDGWY GFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRVIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIGQDLEYKVEDTKIDLWSYNAE LLVALENQHTIDLTDSEMNLFEKTRRQLRENAEMNGNCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALNNRF QIKGVELKSGYKDWLWISFAISCFLCVVLLGFIMWACQRGNIRCNI [SEQ ID NO: 52] (GenPept [gbAEC23340.1](#)). Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

60

SP = 1 - 16

Ectodominio = 17 - 529

65

Sitios de escisión por furina = 345-346

FP = 346-355

Región HRA = 356 - 390

5 Región HRB = 421 - 470

MPER = 470-529

TM = 530-553

10 C = 534 - 556

Región de la cabeza = 51-328, 403-444,

Región del tallo = 17-58, 327-401, 442-509.

15 Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de la HA de la Inf A incluyen:

Ectodominio 1 - 529:

MKTIIAFSCILCLIFAQKLPGSDNSMATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSS
 STGRICNSPHQILDGKNCTLIDALLGDPHCDDFQNKEWDLFVERSTAYSNCYPYVPDYATLRSLVASSGNLEFT
 QESFNWTGVQAQDGSSYACRRGSVNSFFSRLNWLYNLNYKYPEQNVTPNNDKFQDKLYIWGVHHPGTDKDQTN
 LYVQASGRVIVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVRGVSSIISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIQSGKSSIMRS
 DAHIDECNSECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPKEQTRGIFGAIAGFIENGWEG
 MVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQITGKLNRVIKKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKID
 LWSYNAELVALENQHTIDLTDSEMSKLFERTRRQLRENAEDMGNGCFKIHKCDNACIGSIRNGTYDHDIYRN
 EALNNRFQIKGVQLKSGYKD [SEQ ID NO: 53] (GenPept [gbAEC23340.1](#)).

20

Ectodominio menos SP 18 - 529:

KLPGSDNSMATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSTGRICNSPHQILDGK
 NCTLIDALLGDPHCDDFQNKEWDLFVERSTAYSNCYPYVPDYATLRSLVASSGNLEFTQESFNWTGVQAQDGSS
 YACRRGSVNSFFSRLNWLYNLNYKYPEQNVTPNNDKFQDKLYIWGVHHPGTDKDQTNLYVQASGRVIVSTKRS
 QQTVIPNIGSRPWVRGVSSIISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIQSGKSSIMRSDAHIDECNSECITPNG
 SIPNDKPFQNVNKITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPKEQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSE
 GTGQAADLKSTQAAINQITGKLNRVIKKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELVALENQ
 HTIDLTDSEMSKLFERTRRQLRENAEDMGNGCFKIHKCDNACIGSIRNGTYDHDIYRN
 EALNNRFQIKGVQLKSGYKD [SEQ ID NO: 54] (GenPept [gbAEC23340.1](#)).

25 Ectodominio menos SP menos, MPER18 - 469:

KLPGSDNSMATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSTGRICNSPHQILDGK
 NCTLIDALLGDPHCDDFQNKEWDLFVERSTAYSNCYPYVPDYATLRSLVASSGNLEFTQESFNWTGVQAQDGSS
 YACRRGSVNSFFSRLNWLYNLNYKYPEQNVTPNNDKFQDKLYIWGVHHPGTDKDQTNLYVQASGRVIVSTKRS
 QQTVIPNIGSRPWVRGVSSIISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIQSGKSSIMRSDAHIDECNSECITPNG
 SIPNDKPFQNVNKITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPKEQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSE
 GTGQAADLKSTQAAINQITGKLNRVIKKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELVALENQ
 HTIDLTDSEMSKLFERTRR [SEQ ID NO: 55] (GenPept [gbAEC23340.1](#)).

Ectodominio 18 - 341, 346 - 529 más sitios de escisión por furina alterados:

30

KLPGSDNSMATLCLGHHAVPNGTLVKTITDDQIEVTNATELVQSSSTGRICNSPHQILDGK
 NCTLIDALLGDPHCDDFQNKEWDLFVERSTAYSNCYPYVPDYATLRSLVASSGNLEFTQESFNWTGVAQDGSS
 YACRRGSVNSFFSRLNWLYNLNYKYPEQNVTPNNNDKFQDKLYIWGVHHPGTDKDQTNLYQASGRVIVSTKRS
 QQTVIPNIGSRPWVRGVSSIISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIQSGKSSIMRSDAHIDESECITPNG
 SIPNDKPFQNVNKITYGACPRYVKQNTLKLATGMNRNPERRRKRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWWGFRHQ
 SEGTGQAADLKSTQAAINQITGKLNRVIKKTEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVAL
 QHTIDLTDSEMSEKLFERTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDIYRREALNNRFQIKGVQL
 KSGYKD [SEQ ID NO: 56] (GenPept [gbAEC23340.1](#)).

Dominio de tallo 1-58, 327-401, 442-509 más regiones enlazadoras:

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELGFGQ
 NTLKLATGMNRNPPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMLDGWYGRHQNSERGQAAIDLKSTQAAIDQINGMLNRL
 IGGGGSELLVALLNQHTIDLTDSEMNLFEKTKKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYR
 5 DEALNNRFQIKGVELKSGYKD [SEQ ID NO: 57] (GenPept [gbAEC23340.1](#)).

Dominio de cabeza 1-18, 51-328, 403-444 más regiones enlazadoras:

MKTIIALSYILCLVFAQKEVTNATELVQNSSTGGICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDG
 FQNKKWDLFVERSKEYNCYPYDVPDYASLRSVLASSGTLEFNNEFSNWTGVTQNGTSSACKRGSNNSFFSRL
 NWLTHSKFKYPALNVTPMNNEEFQDKLYIWGVHHPGTDNDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVIPNIGSRPRVRNI
 PSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYG
 ACPRYVKQNGGGSGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELL [SEQ ID NO: 58]
 (GenPept [gbAEC23340.1](#)).

10

2.2 HA de la Inf B

Un precursor representativo de la HA de la Inf B tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MKAIIVLLMVVTNSADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTPPTKSHFANLKGQTTRGK
 LCPCNCFNTOLDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCPIMHORTKIRQLPNLLRGYENIRLSTSINVITE
 TAPGGPVKGTSQSCPNVANGNGFFNTMAWVIPKONNKTAIPVTVEPYICSEGEDQJTVWGFHSODKTQME
 RLYGDSNPQKFTSSANGVTHYVSQIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVWCA
 SGRSKVIKGSLPLIGEADCLHEKYGGLNKSKPYITGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGA
 IAGFLEGWEGMIAWGHWGYTSHGANGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNLSELEVKNLQLRLSGAMNELHDEILE
 LDEKVDDLRADTISSQIELAVLLSNEGINSDEHLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHCKCNQTCLDRIAAG
 15
 TTFNAGDFSLPTFDNLNTAASUNDDGLDNHTILYYSTAASSLAVTLMIAIFIYVMVSRONVSCSICL [SEQ ID
 NO: 59] (GenPept [gbAFH57854.1](#)).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

20

SP = 1-16

Ectodominio = 17-547

25

Sitios de escisión por furina = 361-362

FP = 362-382

Región HRA = 383-416

30

Región HRB = 488-547

MPER = 488-547

TM = 548-573

C = 574 - 584

5 Región de la cabeza = 48-344, 418-456

Región del tallo = 17-47, 345-417, 457-547

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodomnio de la HA de la Inf B incluyen:

Ectodominio 1 - 547:

10

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTPTKSHFANLKGT
 QTRGKLCNCNFNCTDLDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCFPIMHDRDKIRQLPNLLRGYENIRLSTS
 NVINTETAPGGPYKVGTSSCPNVANGNGFFNTMAWVIPKDNNKTAINPVTEVPYICSEGEDQITVWGFHSDD
 KTQMERLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYSQIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVVDYMWQKPGKTGTIVYQRGILLPQ
 KVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVTKPLKLANGTKYRPPAKLLKE
 RGFFGAIAGFLEGGWEGMIAWGWHGYTSHGAHGVAVALKSTQEAINKITKNLNLSELEVKNLQRLSGAMNEL
 HDEILELDEKVDDLRADETISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCL
 DRIAAGTFNAGDFSLPTFDLSNITAASLNDGDNHT [SEQ ID NO: 60] (GenPept gbAFH57854.1).

Ectodominio menos SP 17-547:

RICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTPTKSHFANLKGTQTRGKLCNCNFNCTD
 LDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCFPIMHDRDKIRQLPNLLRGYENIRLSTS
 NVINTETAPGGPYKVG
 TSGSCPNVANGNGFFNTMAWVIPKDNNKTAINPVTEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQK
 FTSSANGVTTHYSQIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVVDYMWQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVTKPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
 GMIAGWGWHGYTSHGAHGVAVALKSTQEAINKITKNLNLSELEVKNLQRLSGAMNELHDEILELDEKVDDLRA
 DTISSLQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSLP
 TFDSLNTAASLNDGDNHT [SEQ ID NO: 61] (GenPept gbAFH57854.1).

15

Ectodominio menos SP, menos MPER 17-487:

RICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTPTKSHFANLKGTQTRGKLCNCNFNCTD
 LDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCFPIMHDRDKIRQLPNLLRGYENIRLSTS
 NVINTETAPGGPYKVG
 TSGSCPNVANGNGFFNTMAWVIPKDNNKTAINPVTEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQK
 FTSSANGVTTHYSQIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVVDYMWQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVTKPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
 GMIAGWGWHGYTSHGAHGVAVALKSTQEAINKITKNLNLSELEVKNLQRLSGAMNELHDEILELDEKVDDLRA
 DTISSLQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKKML [SEQ ID NO: 62] (GenPept gbAFH57854.1).

20

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados 17-355, 362-547:

25

RICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLTTPTKSHFANLKGTQTRGKLCNCNFNCTD
 LDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCFPIMHDRDKIRQLPNLLRGYENIRLSTS
 NVINTETAPGGPYKVG
 TSGSCPNVANGNGFFNTMAWVIPKDNNKTAINPVTEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQK
 FTSSANGVTTHYSQIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVVDYMWQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVTKPLKLANGTKYRPPARRKKRAGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAWGWHGYTSHGAHGVAVALKSTQEAINKITKNLNLSELEVKNLQRLSGAMNELHDEILELDEKVDDL
 RADTISSLQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSLP
 LPTFDLSNITAASLNDGDNHT [SEQ ID NO: 63] (GenPept gbAFH57854.1).

Dominio de tallo 1-47, 345-417, 457-547 más regiones enlazadoras:

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTGVIPLGSGLANGTKYRPPA
 KLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNYLSGSGGSGIELAVL
 LSNEGIINSEDEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNCQTCLDRIAAGTFNAGDFSLPTFDLSLNITAASL
 NDDGLDNHT [SEQ ID NO: 64] (GenPept gbAFH57854.1).

Dominio de cabeza 1-17, 48-344, 418-456 más regiones enlazadoras:

MKAIIVLLMVVTSNADRTTPKSHFANLKGQTTRGKLCPCNFNCTLDVALGRPKCMGN
 TPSAKVSIHLHEVKPATSGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTSNTVNTETAPGGPYKVGTSGSCPNVANGNG
 FFNTMAWVIPKDNNKTAIPVTVEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVS
 QIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSLPLIGEADCLHEKY
 GGLNKSKPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKGSGGSGELEVKNLQRLSGAMNELHDEILELDEKVDDOLRADTISS
 Q [SEQ ID NO: 65] (GenPept gbAFH57854.1).

5

2.2.3 F del RSV

Un precursor de la F del RSV no limitativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

10

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTTSVITIELSNIKKNKCNGTDAKV
 LIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGV
 AVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNN
 RLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDOTSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIII
 VIVVILLSLIAVGGLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN [SEQ ID NO: 66] (GenPept gbAHL84194.1).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

15

SP = 1,23

Ectodominio = 24-524

Sitios de escisión por furina = 109-110, 136-137

20

FP = 137-163

Región HRA = 164-196

25

Región HRB = 488-524

TM = 525-548

C = 549 - 574

30

Dominio de interacción D25 = 61-97, 193-240

Ejemplos no limitativos de polipéptidos del ectodominio de F del RSV incluyen:

Ectodominio 1 - 524:

35

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTsvITIELSNI
 KKNKCNGTDAVKLIKQELDKYNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRL
 GFLLGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
 IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTPSEVNLCNVDFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDVTSGVNTLYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHN
 AGKSTTN [SEQ ID NO: 67] (GenPept gbAHL84194.1).

Ectodominio de F del RSV (1-520):

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTsvITIELSNI
 KKNKCNGTDAVKLIKQELDKYNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRL
 GFLLGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
 IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTPSEVNLCNVDFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDVTSGVNTLYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHN
 5 AGK [SEQ ID NO: 146].

Ectodominio menos SP 24-524:

SGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTsvITIELSNIKKNCNGTDAVKLIKQELD
 KYNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLLGVGSIAISGVAVSKVLH
 LEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI SNIETVIEFQQKNNRLLITR
 FSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVQLPLYGVIDTP
 CWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPSEVNLCNVDF
 FNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDVTSGVNTLYV
 NVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNAGKSTTN [SEQ ID NO: 68]
 (GenPept gbAHL84194.1).

10

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados 24-524:

SGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTsvITIELSNIKKNCNGTDAVKLIKQELD
 KYNAVTELQLLMQSTQATNNNANNEPRFMNYTLNNAKKTNVTLSNNNNFLGFLLGVGSIAISGVAVSKVLH
 HLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI SNIETVIEFQQKNNRLLITR
 FFSVAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVQLPLYGVIDTP
 PCWLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPSEVNLCNVDF
 IFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDVTSGVNTLYV
 NVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNAGKSTTN [SEQ ID NO:
 15 69] (GenPept gbAHL84194.1).

Dominio de interacción D25 61-97, 193-240 más regiones enlazadoras:

LSNIKKNCNGTDAVKLIKQELDKYNAVTELQLLMGGDLKNYIDKQLLPTVNQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVN [SEQ ID NO: 70] (GenPept gbAHL84194.1).

20

2.2.4 F del hMPV

- Un precursor ilustrativo de la F del hMPV tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 MSWKVIIIFSLLITPQHGLKESYLEEESCSTITEGYLSVRTGWTNVFTLEVGDVENLTCADGPSLIK
 25 TELDLTKSALRELRVVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVIAKTI
 RESEVTAIKNALKKTEAVSTLGNNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNV
 RQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYRSSVIYMVQL
 PIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEK

KGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNPCKVSTGRH
 PISMVALSPLGALVACYKGVSIGNSRGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPV
 SSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVIIIAVLGSTMILVSFIIKKTKPT
 GAPPELSGVTNNGFIPH [SEQ ID NO: 71] (GenPept [gbAAN52913.1](#)).

5

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-19

10

Ectodominio = 1-490

Sitios de escisión por furina = 102-103

FP = 103-125

15

Región HRA = 126-129

Región HRB = 456-490

20

TM = 491-514

C = 515 - 539

25

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de F del hMPV incluyen:

Ectodominio 1 - 490:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVRTGWYTNVFTLEVDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALREL
 GPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVIAKTIKIRLESEVTAIKN
 ALKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGIT
 PAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQQIKMLLENRAMVRRKGFGILIGVYGSIVYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAP
 SCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNPCKV
 STGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSIGNSRGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPV
 GRPVSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTG [SEQ ID NO: 72] (GenPept
[gbAAN52913.1](#)).

30

Ectodominio menos SP 20-490:

KESYLEESCSTITEGYLSVRTGWYTNVFTLEVDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALREL
 RTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVIAKTIKIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNGVRV
 LATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVS
 NMPTSAGQQIKMLLENRAMVRRKGFGILIGVYGSIVYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQ
 GWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNPCKVSTGRHPISMVALSPLGAL
 VACYKGVSIGNSRGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSFDPVKFPEDQF
 NVALDQVFESIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTG [SEQ ID NO: 73] (GenPept [gbAAN52913.1](#)).

35

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados 20-490:

KESYLEESCSTITEGYLSVRTGWYTNVFTLEVDVENLTCADGPSLIKTELDLTKSALREL
 RTVSADQLAREEQIENPRQSNFVLGAIALGVATAAAVTAGVIAKTIKIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNGVRV
 LATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVS
 NMPTSAGQQIKMLLENRAMVRRKGFGILIGVYGSIVYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQ
 GWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNPCKVSTGRHPISMVALSPLGAL
 VACYKGVSIGNSRGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSFDPVKFPEDQF
 NVALDQVFESIENSQALVOQSNRILSSAEKGNTG [SEQ ID NO: 74] (GenPept [gbAAN52913.1](#)).

2.2.5 F del PIV

- Un precursor de F del PIV ilustrativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
- MPTSI₁LLI₂TTMIMASFCQIDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFE₃TRYLILSLIPKIEDSN₄SCGDQQIK
 QYKRLLDRLI₅IPLYDGLRLQKD₆V₇S₈NQ₉E₁₀N₁₁EDPRTK₁₂R₁₃F₁₄GGV₁₅I₁₆G₁₇V₁₈A₁₉S₂₀Q₂₁I₂₂T₂₃A₂₄V₂₅A₂₆L₂₇V₂₈E₂₉A₃₀K₃₁Q₃₂A₃₃R₃₄S₃₅D₃₆I₃₇E₃₈L₃₉N₄₀K₄₁A₄₂K₄₃S₄₄D₄₅L₄₆E₄₇S₄₈K₄₉E₅₀W₅₁I₅₂E₅₃W₅₄I₅₅R₅₆R₅₇S₅₈N₅₉Q₆₀K₆₁L₆₂S₆₃I₆₄N₆₅H₆₆Q₆₇S₆₈T₆₉I₇₀I₇₁V₇₂L₇₃I₇₄M₇₅I₇₆I₇₇F₇₈I₇₉N₈₀T₈₁I₈₂I₈₃A₈₄V₈₅K₈₆Y₈₇R₈₈I₈₉Q₉₀K₉₁R₉₂N₉₃R₉₄D₉₅Q₉₆N₉₇D₉₈Q₉₉N₁₀₀D₁₀₁Q₁₀₂N₁₀₃D₁₀₄Q₁₀₅N₁₀₆D₁₀₇Q₁₀₈N₁₀₉D₁₁₀Q₁₁₁N₁₁₂D₁₁₃Q₁₁₄N₁₁₅D₁₁₆Q₁₁₇N₁₁₈D₁₁₉Q₁₂₀N₁₂₁D₁₂₂Q₁₂₃N₁₂₄D₁₂₅Q₁₂₆N₁₂₇D₁₂₈Q₁₂₉N₁₃₀D₁₃₁Q₁₃₂N₁₃₃D₁₃₄Q₁₃₅N₁₃₆D₁₃₇Q₁₃₈N₁₃₉D₁₄₀Q₁₄₁N₁₄₂D₁₄₃Q₁₄₄N₁₄₅D₁₄₆Q₁₄₇N₁₄₈D₁₄₉Q₁₅₀N₁₅₁D₁₅₂Q₁₅₃N₁₅₄D₁₅₅Q₁₅₆N₁₅₇D₁₅₈Q₁₅₉N₁₆₀D₁₆₁Q₁₆₂N₁₆₃D₁₆₄Q₁₆₅N₁₆₆D₁₆₇Q₁₆₈N₁₆₉D₁₇₀Q₁₇₁N₁₇₂D₁₇₃Q₁₇₄N₁₇₅D₁₇₆Q₁₇₇N₁₇₈D₁₇₉Q₁₈₀N₁₈₁D₁₈₂Q₁₈₃N₁₈₄D₁₈₅Q₁₈₆N₁₈₇D₁₈₈Q₁₈₉N₁₉₀D₁₉₁Q₁₉₂N₁₉₃D₁₉₄Q₁₉₅N₁₉₆D₁₉₇Q₁₉₈N₁₉₉D₂₀₀Q₂₀₁N₂₀₂D₂₀₃Q₂₀₄N₂₀₅D₂₀₆Q₂₀₇N₂₀₈D₂₀₉Q₂₁₀N₂₁₁D₂₁₂Q₂₁₃N₂₁₄D₂₁₅Q₂₁₆N₂₁₇D₂₁₈Q₂₁₉N₂₂₀D₂₂₁Q₂₂₂N₂₂₃D₂₂₄Q₂₂₅N₂₂₆D₂₂₇Q₂₂₈N₂₂₉D₂₃₀Q₂₃₁N₂₃₂D₂₃₃Q₂₃₄N₂₃₅D₂₃₆Q₂₃₇N₂₃₈D₂₃₉Q₂₄₀N₂₄₁D₂₄₂Q₂₄₃N₂₄₄D₂₄₅Q₂₄₆N₂₄₇D₂₄₈Q₂₄₉N₂₅₀D₂₅₁Q₂₅₂N₂₅₃D₂₅₄Q₂₅₅N₂₅₆D₂₅₇Q₂₅₈N₂₅₉D₂₆₀Q₂₆₁N₂₆₂D₂₆₃Q₂₆₄N₂₆₅D₂₆₆Q₂₆₇N₂₆₈D₂₆₉Q₂₇₀N₂₇₁D₂₇₂Q₂₇₃N₂₇₄D₂₇₅Q₂₇₆N₂₇₇D₂₇₈Q₂₇₉N₂₈₀D₂₈₁Q₂₈₂N₂₈₃D₂₈₄Q₂₈₅N₂₈₆D₂₈₇Q₂₈₈N₂₈₉D₂₉₀Q₂₉₁N₂₉₂D₂₉₃Q₂₉₄N₂₉₅D₂₉₆Q₂₉₇N₂₉₈D₂₉₉Q₃₀₀N₃₀₁D₃₀₂Q₃₀₃N₃₀₄D₃₀₅Q₃₀₆N₃₀₇D₃₀₈Q₃₀₉N₃₁₀D₃₁₁Q₃₁₂N₃₁₃D₃₁₄Q₃₁₅N₃₁₆D₃₁₇Q₃₁₈N₃₁₉D₃₂₀Q₃₂₁N₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄N₃₂₅D₃₂₆Q₃₂₇N₃₂₈D₃₂₉Q₃₃₀N₃₃₁D₃₃₂Q₃₃₃N₃₃₄D₃₃₅Q₃₃₆N₃₃₇D₃₃₈Q₃₃₉N₃₄₀D₃₄₁Q₃₄₂N₃₄₃D₃₄₄Q₃₄₅N₃₄₆D₃₄₇Q₃₄₈N₃₄₉D₃₅₀Q₃₅₁N₃₅₂D₃₅₃Q₃₅₄N₃₅₅D₃₅₆Q₃₅₇N₃₅₈D₃₅₉Q₃₆₀N₃₆₁D₃₆₂Q₃₆₃N₃₆₄D₃₆₅Q₃₆₆N₃₆₇D₃₆₈Q₃₆₉N₃₇₀D₃₇₁Q₃₇₂N₃₇₃D₃₇₄Q₃₇₅N₃₇₆D₃₇₇Q₃₇₈N₃₇₉D₃₈₀Q₃₈₁N₃₈₂D₃₈₃Q₃₈₄N₃₈₅D₃₈₆Q₃₈₇N₃₈₈D₃₈₉Q₃₉₀N₃₉₁D₃₉₂Q₃₉₃N₃₉₄D₃₉₅Q₃₉₆N₃₉₇D₃₉₈Q₃₉₉N₄₀₀D₄₀₁Q₄₀₂N₄₀₃D₄₀₄Q₄₀₅N₄₀₆D₄₀₇Q₄₀₈N₄₀₉D₄₁₀Q₄₁₁N₄₁₂D₄₁₃Q₄₁₄N₄₁₅D₄₁₆Q₄₁₇N₄₁₈D₄₁₉Q₄₂₀N₄₂₁D₄₂₂Q₄₂₃N₄₂₄D₄₂₅Q₄₂₆N₄₂₇D₄₂₈Q₄₂₉N₄₃₀D₄₃₁Q₄₃₂N₄₃₃D₄₃₄Q₄₃₅N₄₃₆D₄₃₇Q₄₃₈N₄₃₉D₄₄₀Q₄₄₁N₄₄₂D₄₄₃Q₄₄₄N₄₄₅D₄₄₆Q₄₄₇N₄₄₈D₄₄₉Q₄₅₀N₄₅₁D₄₅₂Q₄₅₃N₄₅₄D₄₅₅Q₄₅₆N₄₅₇D₄₅₈Q₄₅₉N₄₆₀D₄₆₁Q₄₆₂N₄₆₃D₄₆₄Q₄₆₅N₄₆₆D₄₆₇Q₄₆₈N₄₆₉D₄₇₀Q₄₇₁N₄₇₂D₄₇₃Q₄₇₄N₄₇₅D₄₇₆Q₄₇₇N₄₇₈D₄₇₉Q₄₈₀N₄₈₁D₄₈₂Q₄₈₃N₄₈₄D₄₈₅Q₄₈₆N₄₈₇D₄₈₈Q₄₈₉N₄₉₀D₄₉₁Q₄₉₂N₄₉₃D₄₉₄Q₄₉₅N₄₉₆D₄₉₇Q₄₉₈N₄₉₉D₅₀₀Q₅₀₁N₅₀₂D₅₀₃Q₅₀₄N₅₀₅D₅₀₆Q₅₀₇N₅₀₈D₅₀₉Q₅₁₀N₅₁₁D₅₁₂Q₅₁₃N₅₁₄D₅₁₅Q₅₁₆N₅₁₇D₅₁₈Q₅₁₉N₅₂₀D₅₂₁Q₅₂₂N₅₂₃D₅₂₄Q₅₂₅N₅₂₆D₅₂₇Q₅₂₈N₅₂₉D₅₃₀Q₅₃₁N₅₃₂D₅₃₃Q₅₃₄N₅₃₅D₅₃₆Q₅₃₇N₅₃₈D₅₃₉Q₅₄₀N₅₄₁D₅₄₂Q₅₄₃N₅₄₄D₅₄₅Q₅₄₆N₅₄₇D₅₄₈Q₅₄₉N₅₅₀D₅₅₁Q₅₅₂N₅₅₃D₅₅₄Q₅₅₅N₅₅₆D₅₅₇Q₅₅₈N₅₅₉D₅₆₀Q₅₆₁N₅₆₂D₅₆₃Q₅₆₄N₅₆₅D₅₆₆Q₅₆₇N₅₆₈D₅₆₉Q₅₇₀N₅₇₁D₅₇₂Q₅₇₃N₅₇₄D₅₇₅Q₅₇₆N₅₇₇D₅₇₈Q₅₇₉N₅₈₀D₅₈₁Q₅₈₂N₅₈₃D₅₈₄Q₅₈₅N₅₈₆D₅₈₇Q₅₈₈N₅₈₉D₅₉₀Q₅₉₁N₅₉₂D₅₉₃Q₅₉₄N₅₉₅D₅₉₆Q₅₉₇N₅₉₈D₅₉₉Q₆₀₀N₆₀₁D₆₀₂Q₆₀₃N₆₀₄D₆₀₅Q₆₀₆N₆₀₇D₆₀₈Q₆₀₉N₆₁₀D₆₁₁Q₆₁₂N₆₁₃D₆₁₄Q₆₁₅N₆₁₆D₆₁₇Q₆₁₈N₆₁₉D₆₂₀Q₆₂₁N₆₂₂D₆₂₃Q₆₂₄N₆₂₅D₆₂₆Q₆₂₇N₆₂₈D₆₂₉Q₆₃₀N₆₃₁D₆₃₂Q₆₃₃N₆₃₄D₆₃₅Q₆₃₆N₆₃₇D₆₃₈Q₆₃₉N₆₄₀D₆₄₁Q₆₄₂N₆₄₃D₆₄₄Q₆₄₅N₆₄₆D₆₄₇Q₆₄₈N₆₄₉D₆₅₀Q₆₅₁N₆₅₂D₆₅₃Q₆₅₄N₆₅₅D₆₅₆Q₆₅₇N₆₅₈D₆₅₉Q₆₆₀N₆₆₁D₆₆₂Q₆₆₃N₆₆₄D₆₆₅Q₆₆₆N₆₆₇D₆₆₈Q₆₆₉N₆₇₀D₆₇₁Q₆₇₂N₆₇₃D₆₇₄Q₆₇₅N₆₇₆D₆₇₇Q₆₇₈N₆₇₉D₆₈₀Q₆₈₁N₆₈₂D₆₈₃Q₆₈₄N₆₈₅D₆₈₆Q₆₈₇N₆₈₈D₆₈₉Q₆₉₀N₆₉₁D₆₉₂Q₆₉₃N₆₉₄D₆₉₅Q₆₉₆N₆₉₇D₆₉₈Q₆₉₉N₇₀₀D₇₀₁Q₇₀₂N₇₀₃D₇₀₄Q₇₀₅N₇₀₆D₇₀₇Q₇₀₈N₇₀₉D₇₁₀Q₇₁₁N₇₁₂D₇₁₃Q₇₁₄N₇₁₅D₇₁₆Q₇₁₇N₇₁₈D₇₁₉Q₇₂₀N₇₂₁D₇₂₂Q₇₂₃N₇₂₄D₇₂₅Q₇₂₆N₇₂₇D₇₂₈Q₇₂₉N₇₃₀D₇₃₁Q₇₃₂N₇₃₃D₇₃₄Q₇₃₅N₇₃₆D₇₃₇Q₇₃₈N₇₃₉D₇₄₀Q₇₄₁N₇₄₂D₇₄₃Q₇₄₄N₇₄₅D₇₄₆Q₇₄₇N₇₄₈D₇₄₉Q₇₅₀N₇₅₁D₇₅₂Q₇₅₃N₇₅₄D₇₅₅Q₇₅₆N₇₅₇D₇₅₈Q₇₅₉N₇₆₀D₇₆₁Q₇₆₂N₇₆₃D₇₆₄Q₇₆₅N₇₆₆D₇₆₇Q₇₆₈N₇₆₉D₇₇₀Q₇₇₁N₇₇₂D₇₇₃Q₇₇₄N₇₇₅D₇₇₆Q₇₇₇N₇₇₈D₇₇₉Q₇₈₀N₇₈₁D₇₈₂Q₇₈₃N₇₈₄D₇₈₅Q₇₈₆N₇₈₇D₇₈₈Q₇₈₉N₇₉₀D₇₉₁Q₇₉₂N₇₉₃D₇₉₄Q₇₉₅N₇₉₆D₇₉₇Q₇₉₈N₇₉₉D₈₀₀Q₈₀₁N₈₀₂D₈₀₃Q₈₀₄N₈₀₅D₈₀₆Q₈₀₇N₈₀₈D₈₀₉Q₈₁₀N₈₁₁D₈₁₂Q₈₁₃N₈₁₄D₈₁₅Q₈₁₆N₈₁₇D₈₁₈Q₈₁₉N₈₂₀D₈₂₁Q₈₂₂N₈₂₃D₈₂₄Q₈₂₅N₈₂₆D₈₂₇Q₈₂₈N₈₂₉D₈₃₀Q₈₃₁N₈₃₂D₈₃₃Q₈₃₄N₈₃₅D₈₃₆Q₈₃₇N₈₃₈D₈₃₉Q₈₄₀N₈₄₁D₈₄₂Q₈₄₃N₈₄₄D₈₄₅Q₈₄₆N₈₄₇D₈₄₈Q₈₄₉N₈₅₀D₈₅₁Q₈₅₂N₈₅₃D₈₅₄Q₈₅₅N₈₅₆D₈₅₇Q₈₅₈N₈₅₉D₈₆₀Q₈₆₁N₈₆₂D₈₆₃Q₈₆₄N₈₆₅D₈₆₆Q₈₆₇N₈₆₈D₈₆₉Q₈₇₀N₈₇₁D₈₇₂Q₈₇₃N₈₇₄D₈₇₅Q₈₇₆N₈₇₇D₈₇₈Q₈₇₉N₈₈₀D₈₈₁Q₈₈₂N₈₈₃D₈₈₄Q₈₈₅N₈₈₆D₈₈₇Q₈₈₈N₈₈₉D₈₉₀Q₈₉₁N₈₉₂D₈₉₃Q₈₉₄N₈₉₅D₈₉₆Q₈₉₇N₈₉₈D₈₉₉Q₉₀₀N₉₀₁D₉₀₂Q₉₀₃N₉₀₄D₉₀₅Q₉₀₆N₉₀₇D₉₀₈Q₉₀₉N₉₁₀D₉₁₁Q₉₁₂N₉₁₃D₉₁₄Q₉₁₅N₉₁₆D₉₁₇Q₉₁₈N₉₁₉D₉₂₀Q₉₂₁N₉₂₂D₉₂₃Q₉₂₄N₉₂₅D₉₂₆Q₉₂₇N₉₂₈D₉₂₉Q₉₃₀N₉₃₁D₉₃₂Q₉₃₃N₉₃₄D₉₃₅Q₉₃₆N₉₃₇D₉₃₈Q₉₃₉N₉₄₀D₉₄₁Q₉₄₂N₉₄₃D₉₄₄Q₉₄₅N₉₄₆D₉₄₇Q₉₄₈N₉₄₉D₉₅₀Q₉₅₁N₉₅₂D₉₅₃Q₉₅₄N₉₅₅D₉₅₆Q₉₅₇N₉₅₈D₉₅₉Q₉₆₀N₉₆₁D₉₆₂Q₉₆₃N₉₆₄D₉₆₅Q₉₆₆N₉₆₇D₉₆₈Q₉₆₉N₉₇₀D₉₇₁Q₉₇₂N₉₇₃D₉₇₄Q₉₇₅N₉₇₆D₉₇₇Q₉₇₈N₉₇₉D₉₈₀Q₉₈₁N₉₈₂D₉₈₃Q₉₈₄N₉₈₅D₉₈₆Q₉₈₇N₉₈₈D₉₈₉Q₉₉₀N₉₉₁D₉₉₂Q₉₉₃N₉₉₄D₉₉₅Q₉₉₆N₉₉₇D₉₉₈Q₉₉₉N₁₀₀₀D₁₀₀₁Q₁₀₀₂N₁₀₀₃D₁₀₀₄Q₁₀₀₅N₁₀₀₆D₁₀₀₇Q₁₀₀₈N₁₀₀₉D₁₀₁₀Q₁₀₁₁N₁₀₁₂D₁₀₁₃Q₁₀₁₄N₁₀₁₅D₁₀₁₆Q₁₀₁₇N₁₀₁₈D₁₀₁₉Q₁₀₂₀N₁₀₂₁D₁₀₂₂Q₁₀₂₃N₁₀₂₄D₁₀₂₅Q₁₀₂₆N₁₀₂₇D₁₀₂₈Q₁₀₂₉N₁₀₃₀D₁₀₃₁Q₁₀₃₂N₁₀₃₃D₁₀₃₄Q₁₀₃₅N₁₀₃₆D₁₀₃₇Q₁₀₃₈N₁₀₃₉D₁₀₄₀Q₁₀₄₁N₁₀₄₂D₁₀₄₃Q₁₀₄₄N₁₀₄₅D₁₀₄₆Q₁₀₄₇N₁₀₄₈D₁₀₄₉Q₁₀₅₀N₁₀₅₁D₁₀₅₂Q₁₀₅₃N₁₀₅₄D₁₀₅₅Q₁₀₅₆N₁₀₅₇D₁₀₅₈Q₁₀₅₉N₁₀₆₀D₁₀₆₁Q₁₀₆₂N₁₀₆₃D₁₀₆₄Q₁₀₆₅N₁₀₆₆D₁₀₆₇Q₁₀₆₈N₁₀₆₉D₁₀₇₀Q₁₀₇₁N₁₀₇₂D₁₀₇₃Q₁₀₇₄N₁₀₇₅D₁₀₇₆Q₁₀₇₇N₁₀₇₈D₁₀₇₉Q₁₀₈₀N₁₀₈₁D₁₀₈₂Q₁₀₈₃N₁₀₈₄D₁₀₈₅Q₁₀₈₆N₁₀₈₇D₁₀₈₈Q₁₀₈₉N₁₀₉₀D₁₀₉₁Q₁₀₉₂N₁₀₉₃D₁₀₉₄Q₁₀₉₅N₁₀₉₆D₁₀₉₇Q₁₀₉₈N₁₀₉₉D₁₁₀₀Q₁₁₀₁N₁₁₀₂D₁₁₀₃Q₁₁₀₄N₁₁₀₅D₁₁₀₆Q₁₁₀₇N₁₁₀₈D₁₁₀₉Q₁₁₁₀N₁₁₁₁D₁₁₁₂Q₁₁₁₃N₁₁₁₄D₁₁₁₅Q₁₁₁₆N₁₁₁₇D₁₁₁₈Q₁₁₁₉N₁₁₂₀D₁₁₂₁Q₁₁₂₂N₁₁₂₃D₁₁₂₄Q₁₁₂₅N₁₁₂₆D₁₁₂₇Q₁₁₂₈N₁₁₂₉D₁₁₃₀Q₁₁₃₁N₁₁₃₂D₁₁₃₃Q₁₁₃₄N₁₁₃₅D₁₁₃₆Q₁₁₃₇N₁₁₃₈D₁₁₃₉Q₁₁₄₀N₁₁₄₁D₁₁₄₂Q₁₁₄₃N₁₁₄₄D₁₁₄₅Q₁₁₄₆N₁₁₄₇D₁₁₄₈Q₁₁₄₉N₁₁₅₀D₁₁₅₁Q₁₁₅₂N₁₁₅₃D₁₁₅₄Q₁₁₅₅N₁₁₅₆D₁₁₅₇Q₁₁₅₈N₁₁₅₉D₁₁₆₀Q₁₁₆₁N₁₁₆₂D₁₁₆₃Q₁₁₆₄N₁₁₆₅D₁₁₆₆Q₁₁₆₇N₁₁₆₈D₁₁₆₉Q₁₁₇₀N₁₁₇₁D₁₁₇₂Q₁₁₇₃N₁₁₇₄D₁₁₇₅Q₁₁₇₆N₁

IDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFETRYLILSLPKIEDNSCGDQQIKQYKRLLDRILLPL
 YDGURLQKDVIVSNQESNENTDPNTKNFFGGVIGITIALGVATSAQITAVALVEAKQARSDEKLKEAIRDTNKA
 VQSVQSSIGNLIVAIKSVQDYVNKEIVPSIARLGCEAAGLQLGIALTQHYSELTNIFGDNIGSLQEKGTKLQGIASL
 YRTNITEIFTSTVDKYDIYOLLFTESIKVRVIDVLDNDYSITLQVRLPLLTRLNTQIYKVDSISYNIQNREWYIPLP
 SHIMTKGAFLGGADVKECIEAFSSYICPSDPGFVLNHEMESCLSGNISQCPRTVVTSDIVPRYAFVNGGVVANCI
 TTTCTCNGIGNRINQPPDQGVKIITHKECNTIGINGMLFNTNKEGTLAFYTPNDITLNNSVALDPIDISIELNKA
 KS DLEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQSSTT [SEQ ID NO: 78] (GenPept [gaaAB21447.1](#)).

2,2,6 F del MeV

- 5 Un precursor de F del MeV representativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 MGLKVNVSIAIFMAVLLTLQPTGQIHWNGLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLMPNITLLNN
 CTRVEIAEYRRLRLRTVLEPIRDALNAMTQNIRPVQSVASSRRHKRFAGVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSM
 LNSQAIDNLRASLETTNQAIIEAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKLGKLLRYTEILSLFG
 PSLRDPISAEISIQALSYALGGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRGIKARITHVDTESYLVLSIAYPTLSEIKGVIVH
 10 RLEGVSYNIGSQEWYTTVPKYVATQGYLISNFDESSCTFMPEGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGSTKSCARTLVS
 GSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVVGSRYPDAVYLHRIDL
 GPPILLERLDVGTNLGNAIAKLEDAKELLESSDQILRSMKGLSSTCIVYILIAVCLGGLIGIPALICCCRGRNCNKGEQ
 VMGSRPGLKPDLTGTSKSYVRS [SEQ ID NO: 79] (GenPept [dbjBAB60865.1](#)).
- 15 Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-24

Ectodominio = 1-493

20 Sitios de escisión por furina = 112-113

FP = 113-137

25 Región HRA = 138-171

Región HRB = 454-493

TM = 494-517

30 C = 518 - 550

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de F del MeV incluyen:

- 35 Ectodominio 1-493:

MGLKVNVSIAIFMAVLLTLQPTGQIHWNGLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLMP
 NITLLNNCTRVEIAEYRRLRLRTVLEPIRDALNAMTQNIRPVQSVASSRRHKRFAGVLAGAALGVATAAQITAGIA
 LHQSMLNSQAIDNLRASLETTNQAIIEAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKLGKLLRYT
 EILSLFGPSLRDPISAEISIQALSYALGGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRGIKARITHVDTESYLVLSIAYPTLSE
 IKGVIVHRLLEGVSYNIGSQEWYTTVPKYVATQGYLISNFDESSCTFMPEGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGSTKS
 CARTLVSGSGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVGSRYPDAV
 YLHRIDLGPILLERLDVGTNLGNAIAKLEDAKELLESSDQILRSMKGLSST [SEQ ID NO: 80] (GenPept
[dbjBAB60865.1](#)).

Ectodominio menos SP 25-493:

40

IHWGNLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLMNPNTLLNNCTRVEIAEYRLLRTVLEP
 IRDALNAMTQNIRPVQSVASSRRHKRFAGVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSMILNSQAIDNLRASLETTNQA
 EAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKGLKLLRYYTEILSLFGPSLRDPISAEISIQALSYAL
 GGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRGIKARITHVDTESYLIVLISIAYPTLSEIKGVIVHRLEGVSYNIGSQEWYTTV
 PKYVATQGYLISNFDESSCTFMPEGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGSTKSCARTLVSGSGFNRFILSQGNLIANC
 ASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVGSRRYPDAVYLHRIDLGPPIILLERLDVGTNLGNAI
 AKLEDAKELLESSDQILRSMKGLSST [SEQ ID NO: 81] (GenPept [dbjBAB60865.1](#))

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados:

IHWGNLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLMNPNTLLNNCTRVEIAEYRLLRTVLEP
 IRDALNAMTQNIRPVQ5VASSNNHKWFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSMILNSQAIDNLRASLETTNQA
 IEAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKGLKLLRYYTEILSLFGPSLRDPISAEISIQALSYAL
 GGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRGIKARITHVDTESYLIVLISIAYPTLSEIKGVIVHRLEGVSYNIGSQEWYTTV
 PKYVATQGYLISNFDESSCTFMPEGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGSTKSCARTLVSGSGFNRFILSQGNLIANC
 ASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVGSRRYPDAVYLHRIDLGPPIILLERLDVGTNLGNAI
 5 AKLEDAKELLESSDQILRSMKGLSST [SEQ ID NO: 82] (GenPept [dbjBAB60865.1](#)).

2.2.7 F del HeV

Un precursor de la F del HeV no limitativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATQEVRLKCLLCGIIVLVSLEGLGILHYEKLSKIGLVKGTRKYKIKSNPLTKDIVKMPNVNSVSKCTGTVM
 NYKSRLTGILSPIKGAIELYNNNTHDLVGDVKLAGVVMAGIAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLSSIES
 TNEAVVKLQETAEKTVYVLTALQDYINTNLVPTIDQISCKQTELALDLALKYLSKLDLLFVFGPNLQDPVSNNSMTIQA
 ISQAFGGNYETLLRTLGYATEODOLLESDSIAGQIVYVDLSSYYIIVRVYFPILTEIQQAYVQELLPVSFNNNDNSE
 WISIVPNFVLIRNTLISNIEVKYCLITKKSVICNQDYATPMTASVRECLTGSTDKCPRELVVSSHVPRFALSQQVLF
 ANCISVTCQCQTTGRAISQSSEQTLLMIDNTCTTVLGNIIISLGKYLGSINYNSESIAVGPPVYTDKVDISSQIS
 SMNQSLQQSKDYIKEAQKILDVNPSLISMLSMLSIILYVLISIAALCIGLTFISPVIVEKKRGNSRLDDRQVRPVSN
 GDLYYIGT [SEQ ID NO: 83] (GenPept NP_047111.2).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

15 SP = 1-20

Ectodominio = 1-487

Sitios de escisión por furina = 109-110

20 FP = 110-135

Región HRA = 136-169

25 Región HRB = 456-587

TM = 488-518

30 C = 519 - 546

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de F del HeV incluyen:

Ectodominio 1-487:

MATQEVRLKCLLCGIIVLVLSEGLGILHYEKLKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPN
 VSNVSKCTGTVMENYKSRLTGILSPIKGAIELYNNNTDLGVGVLAGVVMAGIAIGIATAAQITAGVALYEAMK
 NADNINKLKSSESTNEAVVKLQETAEKTVYVLTALQDYINTNLVPTIDQISCKQTELALDLALKYLSDLLFVFGP
 NLQDPVSNSMTIQAISQAFGGNYETLLRTLGYATEDFDDLESQDLSIAGQIVYVDLSSYYIIVRVYFPILTEIQQAYV
 QELLPVSFNNNDNSEWISIVPNFVLIRNTLISNIEVKYCLITKKSVICNQDYATPMTASVRECLGSTDKCPRELVVS
 SHVPRFALSQGVLFANCISVTCQCQTGRAISQSGEQTLLMIDNTTCTTVLGNIIISLGKYLGSINYNSEIAVGP
 PVTYDKVDISSQISSMNQLQQSKDYIKEAQKILDVNPS [SEQ ID NO: 84] (GenPept NP_047111.2).

Ectodominio menos SP 21-487:

SLEGLGILHYEKLKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNSKCTGTVMENYKSRL
 TGILSPIKGAIELYNNNTDLGVGVLAGVVMAGIAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSSESTNEAVV
 KLQETAEKTVYVLTALQDYINTNLVPTIDQISCKQTELALDLALKYLSDLLFVFGPNLQDPVSNSMTIQAISQAFG
 GNYETLLRTLGYATEDFDDLESQDLSIAGQIVYVDLSSYYIIVRVYFPILTEIQQAYVQELLPVSFNNNDNSEWISIVPN
 FVLIRNTLISNIEVKYCLITKKSVICNQDYATPMTASVRECLGSTDKCPRELVSSHVPRFALSQGVLFANCISVT
 CQCQTGRAISQSGEQTLLMIDNTTCTTVLGNIIISLGKYLGSINYNSEIAVGPVYTDKVDISSQISSMNQL
 QQSKDYIKEAQKILDVNPS [SEQ ID NO: 85] (GenPept NP_047111.2).

5

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados 21-487:

SLEGLGILHYEKLKIGLVKGITRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNSKCTGTVMENYKSRL
 TGILSPIKGAIELYNNNTDLGVGVLAGVVMAGIAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSSESTNEAVV
 KLQETAEKTVYVLTALQDYINTNLVPTIDQISCKQTELALDLALKYLSDLLFVFGPNLQDPVSNSMTIQAISQAFG
 GNYETLLRTLGYATEDFDDLESQDLSIAGQIVYVDLSSYYIIVRVYFPILTEIQQAYVQELLPVSFNNNDNSEWISIVPN
 FVLIRNTLISNIEVKYCLITKKSVICNQDYATPMTASVRECLGSTDKCPRELVSSHVPRFALSQGVLFANCISVT
 CQCQTGRAISQSGEQTLLMIDNTTCTTVLGNIIISLGKYLGSINYNSEIAVGPVYTDKVDISSQISSMNQL
 QQSKDYIKEAQKILDVNPS [SEQ ID NO: 86] (GenPept NP_047111.2).

10

2.2.8 F del NiV

Un precursor representativo de la F del NiV tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 MVVILDKRCYCNLILIMISECSVGILHYEKLKIGLVKGTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNSMS
 15 QCTGSVMENYKTRLNGILTPIKGALEYKNNNTDLGVGVLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNI
 NKLKSSESTNEAVVKLQETAEKTVYVLTALQDYINTNLVPTIDKISCKQTELSDLALKYLSDLLFVFGPNLQDP
 VSNSMTIQAISQAFGGNYETLLRTLGYATEDFDDLESITGQIYVDLSSYYIIVRVYFPILTEIQQAYIQELLPV
 FNNDNSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCITKRSVICNQDYATPMTNNMRECLGSTEKCPRELVSSHVPRFA
 LSNGVLFANCISVTCQCQTGRAISQSGEQTLLMIDNTCPTAVLGNVIISLGKYLGSVNVYNSEGIAIGPPVFTDK
 20 VDISSQISSMNQLQQSKDYIKEAQRLDTVNPNSLISMISLMSIILYVLSIASLCIGLTFISFIIVEKKRNTYSRLED
 RVRPTSSGDLYYIGT [SEQ ID NO: 87] (GenPept NP_112026).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

25

SP = 1-20

Ectodominio = 1-487

30

Sitios de escisión por furina = 109-110

FP = 110-135

Región HRA = 136-169

35

Región HRB = 456-487

TM = 488-518

40

C = 519 - 546

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de la F del NiV incluyen:

Ectodominio 1-487:

MVVILDKRCYCNLILMISECSVGILHYEKLISKIGLVGVTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPN
 VSNMSQCTGSVMENYKTRLNGILTPIKGAEIYKNNTNDLVDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMK
 NADNINKLKSSIESNEAVVKLQETAEKTVVLTALQDYINTNLVPTIDKISCKQTESDLALSKYLSDLFVFGP
 NLQDPVSNSMTIQAIQSAGGGNYETLRTLGYATEDFDDLESITGQIYVDSLSSYYIVRVYFPILTEIQQAYIQ
 ELLPV\$FNNDNSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCITKRSVICNQDYATPMTNMRECLTGSTEKCPRELVVSS
 HVPRFALSNGVLFANCISVTQCQTTGRAISQSGEQTLLMIDNTTCPTAVLGNIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGP
 FVFTDKVDISSLQSKDYIKEAQRLLDTVNPS [SEQ ID NO: 88] (GenPept NP 112026).

5

Ectodominio menos SP:

SECSVGILHYEKLISKIGLVGVTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSQCTGSVMENYKT
 RLNGILTPIKGAEIYKNNTNDLVDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSSIESNEA
 VVKLQETAEKTVVLTALQDYINTNLVPTIDKISCKQTESDLALSKYLSDLFVFGPVLQDPVSNSMTIQAIQSQA
 FGGNYETLRTLGYATEDFDDLESITGQIYVDSLSSYYIVRVYFPILTEIQQAYIQELLPV\$FNNDNSEWISIVP
 NFILVRNTLISNIEIGFCITKRSVICNQDYATPMTNMRECLTGSTEKCPRELVVSSHVPRFALSNGVLFANCISV
 TCQCQTTGRAISQSGEQTLLMIDNTTCPTAVLGNIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVFTDKVDISSLQISSMNQS
 LQQSKDYIKEAQRLLDTVNPS [SEQ ID NO: 89] (GenPept NP 112026).

10 Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados:

SECSVGILHYEKLISKIGLVGVTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSQCTGSVMENYKT
 RLNGILTPIKGAEIYKNNTNDLVDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSSIESNEA
 VVKLQETAEKTVVLTALQDYINTNLVPTIDKISCKQTESDLALSKYLSDLFVFGPVLQDPVSNSMTIQAIQSQA
 FGGNYETLRTLGYATEDFDDLESITGQIYVDSLSSYYIVRVYFPILTEIQQAYIQELLPV\$FNNDNSEWISIVP
 NFILVRNTLISNIEIGFCITKRSVICNQDYATPMTNMRECLTGSTEKCPRELVVSSHVPRFALSNGVLFANCISV
 TCQCQTTGRAISQSGEQTLLMIDNTTCPTAVLGNIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVFTDKVDISSLQISSMNQS
 LQQSKDYIKEAQRLLDTVNPS [SEQ ID NO: 90] (GenPept NP 112026).

2.2.9 GP160 del VIH

15

Un precursor ilustrativo de la GP160 del VIH tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: MRVKGTRKNYWWRWGTMLLGMLMICSAAEQLWVTVYYGVPVWKEATTLCASDAKAVNTEVH

NWWATHACVPTDPNPQEVEVLENVTENFNWKNDMVEQMQUEIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNWDRN
 GTMNTTSTRNTTANISRWEIMEGEIKNCFSNVTTSRNKMHKEYALFYKLDVMPIDNGSSYTLINCNTSVITQAC

20

PKVSFEPPIHYCTPAGFALLKNDKFNGTGPCKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEIVIRSENLTDNA
 KTIIVQLNETVVINCRPGNNTRKSIHGPGRAYATGDIIGDIRQAHCNLSEASWNKTLKQIATKLREQFVNKTII
 FNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSAWFSNNTGLNYNNGSNTGGNITLPCRIKQIVNWQEVGKA
 MYAPPIRGNITCSSNITGLLTRDGGNNVTNESEIFRPGGGNMKDWNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRAKRRVVQ

REKRAVGTIGAMFLGFLGAAGSTMGAASLTQVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARV

25

LAVERYLKDQQLLGIWGCSGRICCTTAVPWNASWSNKSLSDDIWNNTWMQWEKEIDNYTGLIYRLIEESQTQQ
 EKNEQDQLLQLDTWASLWNWFSISNWLYIKIFIMIVAGLVGLRIFFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLPAQRGPD
 RPGGIEEEGGERDNGRSIRLVDFLALIWDDLRLSCLFSYHRLRDLLLLVKRVVELLGHRGWEILKYWWNLLQY
 WSQELKNSAVSLFNAAVAEGTDRVIEGIQRIGRGLHIPRRIRQGLERALL [SEQ ID NO: 91] (GenPept

dbiBAF31430.1).

30

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-28

35

Ectodominio = 1-688

Sitios de escisión por furina = 508-509

FP = 509-538

40

Región HRA = 539-587

Región HRB = 631-667

MPER = 668-688

5

TM = 689-711

C = 712 - 861

10

GP41 = 509-861

GP120 = 1-508

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de la GP160 del VIH incluyen:

15

Ectodominio 1-688:

MRVKGTRKNYWWRWGTMLLGMLMICSAAEQLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAV
 NTEVHNWATHACVPTDPNPQEVLLENVTENFNWKNDMVEQMQEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTN
 WDGRNGTMNTTSTRNTTANISRWEIMEGEIKNCFSNVTTSIRNKMKEYALFYKLDVMPIDNGSSYTLCNTS
 VITQACPVSFEPPIHYCTPAGFALLKCNDKFNGTGPCKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEIVRSEN
 LTDNAKTIIVQLNETVVINCTRPGNNTRKSIHIGPGRFYATGDIIGDIRQAHCNLSEASWNKTLKQIATKLREQF
 VNKTIIFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCDTQLFNSAWFSNNTGLNYNNGSNTGGNITLPCRIKQIVNRWQ
 EVGKAMYAPPGRNITCSSNITGLLTDGGNNVTNESEIFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRAK
 RRVVQREKRAVGTIGAMFLGFLGAAGSTMGAASLTQTVQARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQ
 LQARVLAVERYLKDQQLGIWGCSGRILCTTAVPWNASWSNKSLODIWNNTWMQWEKEIDNYTGLIYRLIEE
 SQTQQEKNEQDQLQDTWASLWNWFSISNWLYIK [SEQ ID NO: 92] (GenPept [dbiBAF31430.1](#)).

20 Ectodominio menos SP:

EQLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAVNTEVHNWATHACVPTDPNPQEVLLENVT
 ENFNWKNDMVEQMQEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNWDGRNGTMNTTSTRNTTANISRWEIMEGE
 IKNCFSNVTTSIRNKMKEYALFYKLDVMPIDNGSSYTLCNTS VITQACPVSFEPPIHYCTPAGFALLKCNDK
 KFNGTGPCKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEIVRSEN LTDNAKTIIVQLNETVVINCTRPGNNTRKSI
 HIGPGRFYATGDIIGDIRQAHCNLSEASWNKTLKQIATKLREQFVNKTIIFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFY
 CDTTQLFNSAWFSNNTGLNYNNGSNTGGNITLPCRIKQIVNRWQEVGKAMYAPPGRNITCSSNITGLLTDG
 GNNVTNESEIFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRAKRRVQREKRAVGTIGAMFLGFLGAAGST
 MGAASLTQTVQARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLGIWGCSGRIL
 CTTAVPWNASWSNKSLODIWNNTWMQWEKEIDNYTGLIYRLIEEQTQQEKNEQDQLQDTWASLWNWFSI
 SNWLWYIK [SEQ ID NO: 93] (GenPept [dbiBAF31430.1](#)).

25

Ectodominio menos SP, menos MPER:

EQLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAVNTEVHNWATHACVPTDPNPQEVLLENVT
 ENFNWKNDMVEQMQEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNWDGRNGTMNTTSTRNTTANISRWEIMEGE
 IKNCFSNVTTSIRNKMKEYALFYKLDVMPIDNGSSYTLCNTS VITQACPVSFEPPIHYCTPAGFALLKCNDK
 KFNGTGPCKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEIVRSEN LTDNAKTIIVQLNETVVINCTRPGNNTRKSI
 HIGPGRFYATGDIIGDIRQAHCNLSEASWNKTLKQIATKLREQFVNKTIIFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFY
 CDTTQLFNSAWFSNNTGLNYNNGSNTGGNITLPCRIKQIVNRWQEVGKAMYAPPGRNITCSSNITGLLTDG
 GNNVTNESEIFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRAKRRVQREKRAVGTIGAMFLGFLGAAGST
 MGAASLTQTVQARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLGIWGCSGRIL
 CTTAVPWNASWSNKSLODIWNNTWMQWEKEIDNYTGLIYRLIEEQTQQEKNEQDQLQ [SEQ ID NO: 94]
 (GenPept [dbiBAF31430.1](#)).

30 Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados:

EQLWVTVYVGVPVKEATTLFCASDAKAVNTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLENVT
ENFNMWKNDMVEQMQEDIIISLDQSLKPCVKLPLCCTLNCTNWDRNGTMNTTSTRNTTANISRWEIMEGE
IKNCFSNVTTTSIRNMKHKEYALFYKLDVMPIDNGSSYTLLNCNTSVITQACPKVSFEPPIHYCTPAGFALLCNDK
KFNGTGPKNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEIVRSENLTNAKTIIVQLNETVVIINTRPGNNTRKSI
HIGPGRAYATGDIIGDIRQAHCNLSEASWNKTLKQIATKLREQFVNKTIIIFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFY
CDTTQLFNSAWFSNNNTGLNYNNGSNTGGNITLPCRIKQIVNRWQEVGKAMYAPPIRGNITCSSNITGLLTRDG
GNNVTNENEIIFRGGGNMKDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTNANNVVQREKRAVGTIGAMFLGFLGAAGST
MGAASLTLLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARVLVERYLKDDQQLLGWCGCSRLI
CTTAVPWNASWSNKSLDDIWNNTWMQWEKEIDNYTGLIYRLIEESQTQQEKNEQDLLQDTWASLWNWFSI
SNWLWYIK [SEQ ID NO: 95] (GenPept [dbjBAF31430.1](#)).

Ectodominio de GP41 509-688:

5

VVQREKRAVGTIGAMFLGFLGAAGSTMGAASLTLLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARVLVERYLKDDQQLLGWCGCSRLI
HLLQLTVWGIKQLQARVLVERYLKDDQQLLGWCGCSRLICCTTAVPWNASWSNKSLDDIWNNTWMQWEKEIDNYTGLIYRLIEESQTQQEKNEQDLLQDTWASLWNWFSI
DNYTGLIYRLIEESQTQQEKNEQDLLQDTWASLWNWFSISNWYLWYIK [SEQ ID NO: 96] (GenPept
[dbjBAF31430.1](#)).

2.2.10 GP del EBOV

- 10 Un precursor representativo de la GP del EBOV tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVG
LNLEGNGVATDVPSATKRWGFRSGVPPKVNYEAGEWAENCYNEIICKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYHKV
SGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLIPQAKKDFSSHPLREPVNATEDPSSGYYSTTI
RYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLQLNETIYTSKRSNTTGKLIWVNPEDIITGEWAFWETK
15 KNLTRKIRSEELSFTVVSNGNISGQSPARTSSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTL
ATISTSPQSLLTKPGPDNSTHNTPVYKLDISEATQVEQHRRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTD
LDPATTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKGLITNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAQPKCN PNLHY
WTTQDEGAAIGLAWIPIYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDLL
QRWGGTCHILGPDCCIIEPHDWTKNITDKDQIHHDFVDKLPDQGDNDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVIIAVIA
20 LFCICKFVF [SEQ ID NO: 97] (GenPept [NP_066246.1](#)).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

25

SP = 1-27

Ectodominio = 1-650

Sitios de escisión por furina = 501-502

30

Sitios de escisión por catepsina = 191-192, 201-202

FP = 511-556

Región HRA = 557-593

35

Región HRB = 600-635

MPER = 636-650

40

TM = 651-669

C = 670 - 676

Dominio similar a la mucina = 312-461

45

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de GP del EBOV incluyen:

Ectodominio 1-650:

MGVTGILQLPRCRFKRTSFFLWVIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
 LRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWGFRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
 YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVITYRGTFAEGVVAFLILPQAKKOFFSSHPLREPVNATEDPSSG
 YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWVNPEIDTTIGEW
 FWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVS
 HLTTLATISTSPQSLLTKPGPDNSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAGPPKAENTNTS
 KSTDFLDPATTTSPQNHSSETAGNNNNHQQDTGEESASSGKLGITNTIAGVAGLITGGRRRREAIVNAQPKCNP
 NLHYWTTQDEAAIGLAWIPYFGPAEGLYIEGLMHNQDGGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKA
 IDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVOKTLPDQGDNDNWWTGWRQ [SEQ ID NO:
 98] (GenPept NP_066246.1)

Ectodominio menos SP:

5 QRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWG
 FRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLY
 DRLASTVITYRGTFAEGVVAFLILPQAKKOFFSSHPLREPVNATEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNL
 TYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGA
 KNISGQSPARTSSDPGTNTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVS
 HLTTLATISTSPQSLLTKPGPDNSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSSETAGNNNNHQQDTGEESASSGKLGITNTIAGVAGLITGGRRRREAIVNAQPKCNP
 NLHYWTTQDEAAIGLAWIPYFGPAEGLYIEGLMHNQDGGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVOKTLPDQGDNDNWWTGWRQ [SEQ ID NO: 99] (GenPept NP_066246.1).

Ectodominio menos SP, menos MPER:

QRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWG
 FRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLY
 DRLASTVITYRGTFAEGVVAFLILPQAKKOFFSSHPLREPVNATEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNL
 TYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGA
 KNISGQSPARTSSDPGTNTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVS
 HLTTLATISTSPQSLLTKPGPDNSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSSETAGNNNNHQQDTGEESASSGKLGITNTIAGVAGLITGGRRRREAIVNAQPKCNP
 NLHYWTTQDEAAIGLAWIPYFGPAEGLYIEGLMHNQDGGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVOKTL [SEQ ID NO: 100] (GenPept NP_066246.1).

10

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados:

QRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWG
 FRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLY
 DRLASTVITYRGTFAEGVVAFLILPQAKKOFFSSHPLREPVNATEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNL
 TYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGA
 KNISGQSPARTSSDPGTNTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVS
 HLTTLATISTSPQSLLTKPGPDNSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSSETAGNNNNHQQDTGEESASSGKLGITNTIAGVAGLITGGRNNTMNEAVNAQPKCNP
 NLHYWTTQDEAAIGLAWIPYFGPAEGLYIEGLMHNQDGGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVOKTL [SEQ ID NO: 101] (GenPept NP_066246.1).

15

Ectodominio menos SP, menos dominio similar a la mucina:

QRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWG
 FRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLY
 DRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSGGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNL
 TYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLWVKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVGGNN
 THHQDTGEESASSGKGLGITNTIAGVAGLITGGRRRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPIYFGPA
 AEGIYIEGLMHNQDGLICLRLQLANETTQALQLFLRATTTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCIEPHD
 WTKNITDKIDQIHDVFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQ [SEQ ID NO: 102] (GenPept NP_066246.1).

Ectodominio menos dominio similar a la mucina:

MGVTGILQLPRDRFKRTSFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
 LRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWGFRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
 YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSG
 YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLWVKVNPEIDTTIGEW
 FWETKKNLTRKIRSEESASSGKGLITNTIAGVAGLITGGRRRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAW
 IPIYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICLRLQLANETTQALQLFLRATTTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDC
 CIEPHDWTKNITDKIDQIHDVFVDKTL [SEQ ID NO: 154]

2.2.11 GP del MARV

Un precursor de la GP del MARV no limitativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 MKTCFLISLILIQGTKNLPILEIASNNQPQNVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEAS
 KRWAFRTVGPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPGKSLLDPTNIRDYPKCKTIHHIQGQNPHAQGIALHLWGA
 FFLYDRIASTMYRGKVFTEGNIAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMLNSTNKYWTSSNGTQTNDTGC GAL
 QEYNSTKNQTCAPS KIPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNTTDPS DDEDLATSGSGEREPEHTTSDAVTKQGL
 SSTMPPTPSQPSTPQQGGNNNTHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTISTNNTSKHFSTLSAPLQNTND
 NTQSTITENEQTSAPSITLPPGNPTTAKSTSSKKGPATTAPNTTNEHTS PPPTPSSTAQHLVYFRRKRSILWRE
 GDMFPFLDGLINAPIDFDPVPTKTFDESSSSGASAEDQHASPNISLTSYFPNINENTAYSGENENDCAELR
 IWSVQEDDLAAGL SWIPFFPGPIEGLYTAVLIKQNQLVCRRLR LANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRAIDL
 LTRWGGTCKVLGPDC CIGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWW TSDWGVLTNLGILLLSIAV
 LSCICRIFTKYIG [SEQ ID NO: 103] (GenPept YP_001531156.1).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-19

Ectodominio = 1-650

Sitios de escisión por furina = 434-435

FP = 526-549

Región HRA = 582-598

Región HRB = 611-627

MPER = 628-650

TM = 651-669

C = 651 - 669

Dominio similar a la mucina = 244-425

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de GP del MARV incluyen:

45 Ectodominio 1 - 650:

MKTTCLISLILIQGTKNLPILEIASNNQPQNVDVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVAD
 SPLEASKRWAFTGVPPKVNVEYTEGEAKTCYNISVTDPGKSLLLDPPTNIRDYPKCKTIIHQGQNPHAGQIAL
 HLWGAFFLYDRIASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMMLTSTNKYWTSSNGTQTNDTG
 CFGALQEYNSTKNQTCAPSKIPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNTDPSSDDDELATSGSGSGEREPTTSDAVT
 KQGLSSTMPPTPSPQPSTPQQGGNNNTHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTISTNNTSKHNFSLSAPLQN
 TTNONTQSTITENEQTAPSITTLPPPTGNPTTAKSTSSKGPAATTAPNTTNEHFTSPPPTPSSTAQHLVYFRRKRSI
 LWREGDMFPFLDGLINAPIDFDPVPNTKTIFDESSSSGASAEEDQHASPNISLTSYFPNINENTAYSGENENDC
 DAEELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEGLYTAVLIKQNQNNLVCRRLRANQAKSLELLRVTEERTFSLINR
 HAIDFLLTRWGGTCKVLGPDCIGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWWTDWG [SEQ ID NO:
 104] (GenPept YP_001531156.1).

Ectodominio menos SP 20-650:

PILEIASNNQPQNVDVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWAFTGVPPK
 NVEYTEGEAKTCYNISVTDPGKSLLLDPPTNIRDYPKCKTIIHQGQNPHAGQIALHLWGAFFLYDRIASTTMY
 RGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMMLTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFALQEYNSTKNQTCAP
 SKIPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNTDPSSDDDELATSGSGSGEREPTTSDAVTKQGLSSTMPPTPSPQPST
 PQQGGNNNTHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTISTNNTSKHNFSLSAPLQNNTNDNTQSTITENEQTSA
 PSITTLPPPTGNPTTAKSTSSKGPAATTAPNTTNEHFTSPPPTPSSTAQHLVYFRRKRSILWREGDMFPFLDGLINAP
 IDFDVPNTKTIFDESSSSGASAEEDQHASPNISLTSYFPNINENTAYSGENENDCDAEELRIWSVQEDDLAAGL
 SWIPFFGPGIEGLYTAVLIKQNQNNLVCRRLRANQAKSLELLRVTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGGTCKVLGP
 DCIGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWWTDWG [SEQ ID NO: 105] (GenPept
 YP_001531156.1).

5

Ectodominio menos SP, menos MPER 20-627:

PILEIASNNQPQNVDVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWAFTGVPPK
 NVEYTEGEAKTCYNISVTDPGKSLLLDPPTNIRDYPKCKTIIHQGQNPHAGQIALHLWGAFFLYDRIASTTMY
 RGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMMLTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFALQEYNSTKNQTCAP
 SKIPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNTDPSSDDDELATSGSGSGEREPTTSDAVTKQGLSSTMPPTPSPQPST
 PQQGGNNNTHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTISTNNTSKHNFSLSAPLQNNTNDNTQSTITENEQTSA
 PSITTLPPPTGNPTTAKSTSSKGPAATTAPNTTNEHFTSPPPTPSSTAQHLVYFRRKRSILWREGDMFPFLDGLINAP
 IDFDVPNTKTIFDESSSSGASAEEDQHASPNISLTSYFPNINENTAYSGENENDCDAEELRIWSVQEDDLAAGL
 SWIPFFGPGIEGLYTAVLIKQNQNNLVCRRLRANQAKSLELLRVTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGGTCKVLGP
 DCIGIEDLSKNISEQIDQI [SEQ ID NO: 106] (GenPept YP_001531156.1).

10

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados:

PILEIASNNQPQNVDVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWAFTGVPPK
 NVEYTEGEAKTCYNISVTDPGKSLLLDPPTNIRDYPKCKTIIHQGQNPHAGQIALHLWGAFFLYDRIASTTMY
 RGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMMLTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFALQEYNSTKNQTCAP
 SKIPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNTDPSSDDDELATSGSGSGEREPTTSDAVTKQGLSSTMPPTPSPQPST
 PQQGGNNNTHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTISTNNTSKHNFSLSAPLQNNTNDNTQSTITENEQTSA
 PSITTLPPPTGNPTTAKSTSSKGPAATTAPNTTNEHFTSPPPTPSSTAQHLVYFNNNSILWREGDMFPFLDGLINAP
 IDFDVPNTKTIFDESSSSGASAEEDQHASPNISLTSYFPNINENTAYSGENENDCDAEELRIWSVQEDDLAAGL
 SWIPFFGPGIEGLYTAVLIKQNQNNLVCRRLRANQAKSLELLRVTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGGTCKVLGP
 PDCCIGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWWTDWG [SEQ ID NO: 107] (GenPept
 YP_001531156.1).

15 Ectodominio menos SP, menos dominio similar a la mucina:

PILEIASNNQPQNVDSVCSGLQKTEDVHLMGFTLSQQKVADSPLEASKRWAFRGVPPK
 NVEYTEGEAEAKTCYNISVTDPGKSLLDPTNIRDYPKCKTIHHIQGQNPQAQGIALHLWGAFFLYDRIASITMY
 RGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFSRQGQGYRHMMNTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFCALQEYNSTKNQTCAP
 SKIPPLPTARPEIKLGGAQHLVYFRRKRSILWREGDMFPFLDGLINAPIFDOPVNTKTIFDESSSGAASEEDQ
 HASPNISLTLSYFPNINENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEGLYTAVLIKQNQNLVCR
 LRRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRHAIDFLTRWGGTCKVLGPDCCGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEG
 TGWGLGGKWWTSWDW [SEQ ID NO: 108] (GenPept YP_001531156.1).

2.2.12 S del SARS-CoV

- 5 Un precursor ilustrativo de la S del SARS-CoV tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 MFIFLLFTLTSQSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFPLFYSNVT
 GFHTINHTFGNPVIPFKDGIFYFAATEKSNVRGWFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKP
 MGTQTHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYKGYQPIDVRDLPGFNTLKPI
 10 FKPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTDAVDCSQNPLAEKCSVKSFEID
 KGIYQTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGSAT
 KLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYYKRYRLH
 GKLRPFERDISNPVSPDGKPCTPPALNCYWPLNDYGFYTTGIGYQPYRVVVSFELLNAPATVCGPKLSTDLIK
 15 NQCVNFNFNGLTGTGVLTTPSSKRFPQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFCGGSVITPGTNASSEVAV
 LYQDVNCTNVSAAIHADQLTPAWRIYSTGNNNFQQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTSLLRSTSQ
 KSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAPI NFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNR
 ALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKPTPLKYFGGFNSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECL
 GDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAAQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVL
 YENQKQIANQFNKAISQIQESLTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEV
 20 QIDRLITGRLQLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGGYHLMSPQAAPHGVVFLHVT
 YVPSQERNFTTAPAIACHEGKAYFPREGVVVFNGTSWITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCVDVIGIINNTVYDPLQ
 PELDSFKGEELDKYFKNHTSPDVLDLDisGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWVW
 LGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDSEPVLKGVKLHYT [SEQ ID NO: 109] (GenPept
gbAAR86788.1).

25 Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-13

30 ¿Ectodominio = 1-1199?

sitios de escisión por proteasa similar a la tripsina de las vías respiratorias humanas = 667-668

FP = 770-788

35 Región HRA = 892-1013

Región HRB = 1145-1187

40 MPER = 1188-1199

TM = 1200-1216

C = 1217 - 1255

45 Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de la S del SARS-CoV incluyen:
Ectodominio 1 - 1199:

MFIFLLFLTLTSGSOLDRCTTFDOVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPF
 YSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGVWVFGSTMNNKSQSIIINNNTNVIRACNFELCDNPFF
 AVSKPMGTQTHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLOVSEKSGNFKHLREFVKNKDGFLYVYKGYPIDVVRDLPNGF
 NTLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTMLKYDENGTTDAVDCSQNPLAELKCSV
 KSFEIDKGIVQTSNFRVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAKERKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKC
 YGVSATKLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPPDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNINYK
 YRYLRHGKLRPFERDISNPSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTGIGYQPYRVVVLSEELLNAPATVCGPL
 STDLIKNQCVNFNFNGLTGTGLTPSSKRFQPFQQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSITPGTNA
 SSEAVLYQDVNCTNSAAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSL
 LRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSF
 CTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKPTLKYGFFGNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMK
 QYGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPPLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTGAGAAALQIPFAMQMAYRFNGIG
 VTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQUESLTITSTALGKLQDVNVQNAQALNTLVQLSSNFGAISSVLNDILSRD
 KVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGV
 VFLHVTYVPSQERNFTTAPAIACHEGKAYFPREGVFVFNGETSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTV
 YDPLQPELDASFKGELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVNVNIKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP
 WYVW [SEQ ID NO: 110] (GenPept [gbAAR86788.1](#)).

Ectodominio menos SP:

SOLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINH
 TFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGVWVFGSTMNNKSQSIIINNNTNVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQTH
 TMIFDNAFNCTFEYISDAFSLOVSEKSGNFKHLREFVKNKDGFLYVYKGYPIDVVRDLPNGFNTLKPIFKLPLGI
 NITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTMLKYDENGTTDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIVQT
 SNFRVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAKERKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNDL
 CFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPPDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNINYKRYLRHGKLRP
 ERDISNPSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTGIGYQPYRVVVLSEELLNAPATVCGPLSTDLIKNQCVNF
 NFNGLTGTGLTPSSKRFQPFQQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSITPGTNASSEAVLYQDVN
 CTNSAAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLRSTSQKSIVAYT
 MSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAA
 EQDRNTREVFAQVKQMYKPTLKYGFFGNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINAR
 DLICAQKFNGLTVLPPPLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTGAGAAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQK
 QIANQFNKAISQIQUESLTITSTALGKLQDVNVQNAQALNTLVQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLI
 TGRQLSQLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVFLHVTYVPSQ
 ERNFTTAPAIACHEGKAYFPREGVFVFNGETSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDASF
 KGELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVNVNIKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVW [SEQ
 ID NO: 111] (GenPept [gbAAR86788.1](#)).

5

Ectodominio menos SP, menos MPER:

SDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINH
 TFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSIIINNSTNVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQTH
 TMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKGFLYVYKGYQPIDVVRDLPNGFNTLKPIFKLPLGI
 NITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGALKPTTMLKYDENGTTDAVDCSQNPLAELCSVKSFEIDKGIYQT
 SNFRVVPNGDVRFPNITNLCPFGEVFNAFKPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFCYGVSATKLNDL
 CFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQGTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYYKRYLRHGKLRPF
 ERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPLSTDLIKNCVNF
 NFNGLTGTGVLTGPSSKRFQPFQQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSITPGTNASSEAVLYQDVN
 CTNVSAIAHADQLTPAWRIYSTGNNVQFTQAGCLIGAEHVDTSYECOPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYT
 MSLGADSSIAYSNNTIAPITNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMICGDSTE CANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAA
 EQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQLPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTADAGFMKQYGECLGGINAR
 DLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAAQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLNENQK
 QIANQFNKAISQIQESLTTSALGKLQDVNVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLI
 TGRLQSLQTYTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDPCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLHVTYVPSQ
 ERNFTTAPAICHEGKAYFREGVVFNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDSE
 KGELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNEŠLIDLQELGKYEQYIKWPWYVW [SEQ
 ID NO: 111] (GenPept [gbAAR86788.1](#)).

2.2.13 S del MERS-CoV

- 5 Un precursor ilustrativo de la S del MERS-CoV tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
 MIHSVFLMFLLPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIYPQGRRTYSNIT
 ITYQGLFPYQGDHGDMYVYSAGHATGTTPKLFVANYSQDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKI
 YPAFMLGSSVGNFSDGKMGRRFNHTLVLPPDGCCTLLRAFYCILEPRSGNHC PAGNSYTSFATYHTPATDCSDG
 NYRNNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTINYTEDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQATLPVYDTIKYY
 10 SIIPHSIRSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLDFSVGDYIIRRайдCGFNDLSQLHCSFDVESGVYSVSSFEAK
 PSGSVEVQAEQVECD FSPLLSGTPPVYN FKRLVFTNCN YN LTKLLSLFSVN D FTCQISQSPAAIASNCYSSLILDYF
 SYPLSMKSDLGVSSAGPISQFNQKQSFSNPTCLILATVPHNLTTIKPLKYSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQ
 YSPCVSIVPSTVWEDGDYYRKQLSPLEGGFWLASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKT
 15 ASQLGNCVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVQRQRFVYDAYQNLVGYYSDDGNYYCLRACSVSPVSVIYDKE TKT
 HATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPT
 LTPRSVRSPVPGEMRLASIAFNHPIQVDQFNNSYFKLISIPTNFSFGTVQEYIQTIIQKVTVDCQYICNGFQKCEQL
 LREYGQFCSKINQALHGANLRRQDDSVRNLFASVQKSSQSSPIPGFGGGDFNLTLLEPV SISTGSRSARSAIEDLLFD
 KVTIADPGYMQGYDDCMQGPASARDLICAQYVAGYKVLPPLMVNMEAAYTSSLGSIAGVGVWTAGLSSFAA
 20 IPFAQSIFYRLNGVGITQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTNEAFRKVQDAVNNNAQALSKLAELSNTF
 GAISASIGDIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLLTLLNAFVAQQLVRSEASAQLAKDKVNECVKAQSKRSGFCGQ
 GTHIVSFVNVNAPNGLYFMHGYYPSNHIEVVSAYGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNTRIVDEWSYTGSSFYSP
 EPITSLNTKYVAPQVTYQNISTNLLPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKVNSTSIPNFGSLTQINTLLDLTYEMLSQQ
 VVKALNESYIDLKELGNYTYYNKWPWYIWGLFIAGLVALACVFFILCCTGCGTNCMGKLKCNRCDCRYEEYDLE
 PHKvhvH [SEQ ID NO: 113] (GenPept [gbAHX00711.1](#)).

25 Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-21

30 Ectodominio = 1-1301

Sitios de escisión por furina = 751-752, 887-888

FP = 888-891, 951-980

35 Región HRA = 984-1105

MPER = 1295-1301

40 TM = 1203-1218

C = 1319 - 1353

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de la S del MERS-CoV incluyen:

Ectodominio 1 - 1301:

MIHSVFLMFLLPTESYDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIYPQGR
 TYSNITITYQGLFPYQGDHGDMYVYSAGHATGTPQKLFVANYSQDVQFANGFVRIGAAANSTGTVIISPSTS
 ATIRKIYPAFMGLGSSVGNFSQDGKMGRRFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATD
 CSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTPMYTNTDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYD
 TSQYYSIIPHSIRSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDFSVQDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCSYESFDVESGVYSS
 FEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLI
 LDYFSYPLSMKSDLGVSSAGPISQFNYKQSFNSNPTCLILATVPHNLTITKPLKYSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVN
 ANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQLSPLEGGGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFAN
 DTKIASQLGNVCVEYSLYGVSGRGFVQNCTAVGVRQRFVYDAYQNLVGYSSDDGNYYCLRACVSPVSVIYDKE
 TKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLQGSQLCALPDT
 PSTLTPRSVRSPGEMRLASIAFNHPIQVDQFNSSYFKLISIPTNFSFGVTQEYIQTTLQKVTVDCQYICNGFQKC
 EQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLFASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLEPVSIHGSRARSATEDL
 LFDKVTIADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSSLLGSIAGVGVWTAGLSS
 FAAIPFAQSIFYRLNGVGITQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGTTTNEAFRKVQDAVNNNAQALSKLASELS

5

NTFGAISASIGDIQRLDYLEQDAQIDRDLINGRLTTLNAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVNECVKAQSKRSGF
 CGQGTHIVSFVVNAPNGLYFMHVGYPPSNHIEVVSAYGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNTRIVDEWSYTGSSF
 YSPEPITSLNTKYVAPQVTYQNISTNLPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKNVSTSIPNFGSLTQINTTLLDTYEMLSL
 QQVVKALNESYIDLKELGNYTYYNKWPWYIWL [SEQ ID NO: 114] (GenPept [gbAHX00711.1](#)).

Ectodominio menos SP 22-1301:

GPDHSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIYPQGRRTYSNITITYQGLFPYQGDHG
 DMVYVYSAGHATGTPQKLFVANYSQDVQFANGFVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMGLGSSVGNFS
 DGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYF
 NLRNCTPMYTNTDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSIRSIQSDRKA
 WAAFYVYKLQPLTFLLDFSVQDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCSYESFDVESGVYSSFEAKPSGSVVEQAEGVECD
 FSPLLSGTPPQVNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLIDYFSYPLSMKSDLGVSSA
 GPISQFNYKQSFNSNPTCLILATVPHNLTITKPLKYSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWED
 GDYRKQLSPLEGGGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGNVCVEYSLY
 VSGRGFVQNCTAVGVRQRFVYDAYQNLVGYSSDDGNYYCLRACVSPVSVIYDKE^TKTHATLFGSVACEHIS
 TMSQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLQGSQLCALPDTSTLTPRSVRSPGEMRL
 ASIAFNHPIQVDQFNSSYFKLISIPTNFSFGVTQEYIQTTLQKVTVDCQYICNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQAL
 HGANLRQDDSVRNLFASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLEPVSIHGSRARSATEDLFDKVTIADPGYMQGYD
 DCMQQGPASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSSLLGSIAGVGVWTAGLSSFAAIPFAQSIFYRLNGVG
 TQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGTTTNEAFRKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFGAISASIGDIQRLDV
 LEQDAQIDRDLINGRLTTLNAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVNECVKAQSKRSGFCGQGTHIVSFVVNAPNG
 YFMHVGYPPSNHIEVVSAYGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNTRIVDEWSYTGSSFYSPEPITSLNTKYVAPQV
 YQNISTNLPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKNVSTSIPNFGSLTQINTTLLDTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELG
 NYTYYNKWPWYIWL [SEQ ID NO: 115] (GenPept [gbAHX00711.1](#)).

10

Ectodominio menos SP, menos MPER 22-1291:

GPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIYPQGRRTYSNITITYQGLFPYQGDHG
DMYVYSAGHATGTTPKLFWANYSQDVKQFANGFVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMLGSSVGNFS
DGKMGRFFNHTLVLLPDGCGLRACYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYF
NLRNCTFMYTINYITEDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSIRSISDRKA
WAAFYVYKLQPLTFLLDFSVGDGYIRRайдCGFNDLSQLHCSYESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECD
FSPLLSGTPPQVNFKRLVFTNCNYNLTKLSSLFVNDFTCSQISPAIAASNCYSSLIDYFSYPLSMKSDLGVSSA
GPISQFNQKQSFSNPTCLILATVPHNLTITKPLKSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWED
GDYRKQLSPLLEGGLWLAVASGSTVAMTEQLQMFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGNCVEYSLYG
VSGRGVFQNCTAVGVRQRQFVYDAYQNLVGYSSDDGNYYCLRACVSVPVSVIYDKEKTHATLFGSVACEHISS
TMSQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLTPRSVRSPGEMRL
ASIAFNHPIQVDQFNSSYFKLISPTNFSFGVTQEYIQTIIQKVTVCKQYICNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQAL
HGANLRQDDSVRNLFAVKSSQSSPIPGFGDFNLTLEPVSIStGSRSARSAIEDLLFDKVTIADPGYMQGYD
DCMQQGPASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSSLGSIAGVGTAGLSSFAIPFAQSIFYRLNGVGI
TQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGTTTNEAFRKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFGAISASIGDIQRLDV
LEQDAQIDRJINGRLTTLNAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVNECVKAQSKRSGFCGQGTHIVSFVNAPNGL
YFMHVGYPPSNHIEVVSAVGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNTRIVDEWSYTGSSFSPEPITSLNTKYVAPQVT
YQNIISTNLPPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKNVSTSIPNFGSLTQINTTLLDTYEMSLQQVVKALNESYIDLKELG
NYTY [SEQ ID NO: 116] (GenPept [gbAHX00711.1](#)).

Ectodominio menos SP más sitios de escisión por furina alterados:

GPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIYPQGRRTYSNITITYQGLFPYQGDHG
DMYVYSAGHATGTTPKLFWANYSQDVKQFANGFVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMLGSSVGNFS
DGKMGRFFNHTLVLLPDGCGLRACYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYF
NLRNCTFMYTINYITEDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSIRSISDRKA
WAAFYVYKLQPLTFLLDFSVGDGYIRRайдCGFNDLSQLHCSYESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECD
FSPLLSGTPPQVNFKRLVFTNCNYNLTKLSSLFVNDFTCSQISPAIAASNCYSSLIDYFSYPLSMKSDLGVSSA
GPISQFNQKQSFSNPTCLILATVPHNLTITKPLKSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWED
GDYRKQLSPLLEGGLWLAVASGSTVAMTEQLQMFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGNCVEYSLYG
VSGRGVFQNCTAVGVRQRQFVYDAYQNLVGYSSDDGNYYCLRACVSVPVSVIYDKEKTHATLFGSVACEHISS
TMSQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLTPNSVNSVPGEMRL
ASIAFNHPIQVDQFNSSYFKLISPTNFSFGVTQEYIQTIIQKVTVCKQYICNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQAL
HGANLRQDDSVRNLFAVKSSQSSPIPGFGDFNLTLEPVSIStGSNSAISAIEDLLFDKVTIADPGYMQGYD
DCMQQGPASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSSLGSIAGVGTAGLSSFAIPFAQSIFYRLNGVGI
TQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGTTTNEAFRKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFGAISASIGDIQRLDV
LEQDAQIDRJINGRLTTLNAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVNECVKAQSKRSGFCGQGTHIVSFVNAPNGL
YFMHVGYPPSNHIEVVSAVGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNTRIVDEWSYTGSSFSPEPITSLNTKYVAPQVT
YQNIISTNLPPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKNVSTSIPNFGSLTQINTTLLDTYEMSLQQVVKALNESYIDLKELG
NYTYNNKWPWYIWL [SEQ ID NO: 117] (GenPept [gbAHX00711.1](#)).

5

2.2.14 G del VSV

- Un precursor de la G del VSV ilustrativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:
MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFNQKGWNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVKMPKSHK
AIQADGWMCHASKWVTCDFRWYGPKYITQSIERSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPFGPPQSCGYATVDAE
AVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTWHSDYKVKGLCDNSLNISMIDTFFSEDGELSS
LGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSDVDS
LIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPFTIINGTLKYFETTRYIRVDIAAPILSRMVMGMS
GTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSLHLSKAQVFEHPHIQDAASQLPDES
LFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWKKSSIASFFIIGLFLRVGIHLCIKLKHTKRQIYTDIEMNRLG [SEQ ID NO:
118] (GenPept [gbADX53329.1](#)).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-17

Ectodominio = 1-462

5

MPER = 421-462

TM = 462-483

10

C = 484 - 510

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de la G del VSV incluyen:

Ectodominio 1 - 462:

15

MKCLLYAFLFIGVNCKFTIVPHNQKGKGNWKNVPSNYHCPSSDLNWHNDLIGTAKVQKMPKSHKAIQADGWMCM
 MPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTQGTWLNGFPPQSCGYATVDAEAVIVQVTPHH
 TVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTWHSYKVKGLCDNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRS
 DGEGLSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQ
 TSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGAFTIINGTLKFETRYIRVDIAAPILSR
 MVGMISGTTTERELWDWAPYEDVEIGPNGVLRSSGYKFPYLMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEPHPTQDAASQLPDDESLFFGDTGLSK
 QLPDDESLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWWK [SEQ ID NO: 119] (GenPept [gbADX53329.1](#)).

20 Ectodominio menos SP:

FTIVPHNQKGKGNWKNVPSNYHCPSSDLNWHNDLIGTAKVQKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTQGTWLNGFPPQSCGYATVDAEAVIVQVTPHH
 VLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTWHSYKVKGLCDNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRS
 NYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDY
 SLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGAFTIINGTLKFETRYIRVDIAAPILSRMVGMI
 DWAPYEDVEIGPNGVLRSSGYKFPYLMIGHGMLDSDLHLSSKAQVFEPHPTQDAASQLPDDESLFFGDTGLSK
 NPIELVEGWFSWWK [SEQ ID NO: 120] ([gbADX53329.1](#)).

Ectodominio menos SP, menos MPER:

25

FTIVPHNQKGKGNWKNVPSNYHCPSSDLNWHNDLIGTAKVQKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTQGTWLNGFPPQSCGYATVDAEAVIVQVTPHH
 VLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTWHSYKVKGLCDNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRS
 NYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDY
 SLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGAFTIINGTLKFETRYIRVDIAAPILSRMVGMI
 DWAPYEDVEIGPNGVLRSSGYKFPYLMIGHGMLDSDLHLSSKAQVF [SEQ ID NO: 121] (GenPept
[gbADX53329.1](#)).

2.2.15 GP del RABV

- 30 Un precursor de la GP del RABV ilustrativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: MIPQTLLFVPLLVSLSLFGKFPYTIPIDKLGPWSPIDIHLSCLPNLVEDEGCTNLGFSYMEKVGVY
 ISAIKVNNGFTCTGVVTEAETYTNFVGVTTFKRFKHFRTPDACRAAYNWKMAGDPRYEESLHNYPDYHWLRTV
 KTTKESLVIISPSVSQSDLPYDKSLHSRVPFGKCSGITVSSTYCPNTNHDYTIWMPENPRLGTCDFNSRGKRAS
 KGSKTCGFVDERGLYKSLKGACKLKGVLGLRMLDGWTAAIQTSD
 35 EA
 KWCPPDQLVNIHDFRSDEHLVVEE
 LVKKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLM
 MEADAHYKSVRTWNEIIPSKGCLRVGGRC
 HPHVNGVFFNGIILGPDPGHVLIPEMQSSLLQQH
 MELLESSVIPLMPLADPSTVFKDGDEADFVEVHLPDVHKQ
 VSGVDLGLPSWGKYVMSVGTIALMLMILLTCCRKANGAESIQHRLGETGRKVS
 TQNGRVISSWESYKSG
 GETKL [SEQ ID NO: 122] (GenPept [gbAFM52658.1](#)).
- 40 Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-20

Ectodominio = 1-458

TM = 459-478

5

C = 479 - 524

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de GP del RABV incluyen:

10 Ectodominio 1-458:

```

MIPQTLLPVPLLVFSLCFGKFPITYTIPDKGPWSPIDINHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYM
ELKVGYISATKVNGFTCTGVVTEAETYTNFVGVTTFKRKHFRPTDACAAYNWKMAGDPRYEEESLHNYPDY
HWLRTVKTTKESLVIISPSVSSDLPYDKSLHSRVPFGKCSGITVSSYCPTNHDYTIWMPENPRLGTSCDIFTNS
RGKRASKGSKTCGFVDERGLYKSLKGACKLKGVLGLRLMDGTWAAIQTSDEAKWCPPDQLVNIHDFRSDEI
EHLVVEELVKKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGKAYTIFNKTLMEDAHYKSVRTWNEIIPSKGC
LRVGGRCRCHPHVNGVFFNGIILGPDGHVLIPEMQSSLQQHMELLESSVIPLMPLADPSTVFKDGDEAEDFVEVH
LPDVHKQVSGVDLGLPSWGK [SEQ ID NO: 123] (GenPept gbAFM52658_1).

```

15

Ectodominio menos SP:

```

FPIYTIPDKGPWSPIDINHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYMELKVGYISATKVNGFTCTG
VVTEAETYTNFVGVTTFKRKHFRPTDACAAYNWKMAGDPRYEEESLHNYPDYHWLRTVKTTKESLVIISPS
VSSDLPYDKSLHSRVPFGKCSGITVSSYCPTNHDYTIWMPENPRLGTSCDIFTNSRGKRASKGSKTCGFVDE
RGLYKSLKGACKLKGVLGLRLMDGTWAAIQTSDEAKWCPPDQLVNIHDFRSDEIEHLVVEELVKKREECLDA
LESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGKAYTIFNKTLMEDAHYKSVRTWNEIIPSKGCLRGGRCRCHPHVNGVFFN
GILGPDGHVLIPEMQSSLQQHMELLESSVIPLMPLADPSTVFKDGDEAEDFVEVHLPDVHKQVSGVDLGLPS
WGK [SEQ ID NO: 124] (GenPept gbAFM52658_1).

```

20 2.2.16 Gb del HSV1

Un precursor de la Gb del HSV1 ilustrativo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRQGAPARGCRWFVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAATQAANGPATPAPPALGAAPTG
DPKPKNKKPKPNPTPPRPGDNATVAAGHATLREHLDIKAESTDANFYVCPPPTGATVVQFEQPRRCPTRPEGQ25 NYTEGIAVVFKENIAPYKFATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVRSTAKEYVR
NNLETTAFHRDDHETDMELK PANAAATRTSRGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEV DARSVYPYDEFVL
ATGDFVYMSPFYGYREGSHTEHTSYAADRFKQVDGFYARDLTTKARATAPTRNLLTPKFTVAWDWPKRPSV
CTMTKWQEVDCLRSEYGGSFRFSSDAISTTFTNLTEYPLSRVLDGDCIGKDARDAMDRIFARRYNATHIKVG30 QPQYYLANGGFLIAYQPLSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPTPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQ
RHVNDMLGRVIAWCELQNHELTWNEARKLNPNAIASATVGRRVSAARMLGDVMAVSTCPVVAADNVIVQNS
MRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEYAYSHQLSR
ADITTVSTFIDLNTMLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRNNQLHDLRFADIDTVIHADANAAMFAGLGA
FFEGMGDLGRAVGKVVVMGIVGGGVSAVSGVSSFMSNPFGALAVGLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNP MKALYP
35 LTTKELKNPTNPDASGEGEEGGDFDEAKLAEAREMIRYMALVSAMEHTEHKAKKGTSALLSAKVTDMVMRKRR
NTNYTQVPNKDGDADDL [SEQ ID NO: 125] (GenPept gbAAF04615_1).

Esta secuencia comprende los siguientes dominios/fracciones:

SP = 1-24

40

Ectodominio = 1-774

TM = 775-795

45

C = 796 - 904

Ejemplos no limitativos de polipéptidos de ectodominio de Gb del HSV1 incluyen:

Ectodominio 1-774:

50

MRQGAPARGCRWFVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAL
 GAAPTGDPKPKKKKKPKNPTPPRPGAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAESTDANFYVCPPPTGATVVQFEQPRRCPTREGQNYTEGIAVVFKENIAPYKF
 KATMYYKDVTVSQWWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVCRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDME
 LKPKANAATRTSRGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEVADARSVPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGS
 HTEHTSYAADRKFQVQDGFYARDLTTKARATAPTRNLLTPKFTVAWDWVPKPSVCTMKWQEVDMLRSEY
 GGSFRFSSDAISTTFTNLTEYPLSRVDLGDCIGKDARDAMDRIFARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPLL
 SNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNIQRHVNDMLGRVAIACELQ
 NHETLWNEARKLNPNATIASATGRRVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQNSMRISSSPGACYSRPLVSFRY
 EDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEYAYSHQLSRADITVSTFIDLNITMLEDHE
 FVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLRFADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMDLGRAVGKVVMMGI
 VGGVVSAVSGVSSFMSNP [SEQ ID NO: 126] (GenPept gbaAF04615.1).

5 Ectodominio menos SP 25-775:

VLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPALGAAPTGDPKPKKKKKPKNPTPPRPA
 GDNATVAAGHATLREHLRDIKAESTDANFYVCPPPTGATVVQFEQPRRCPTREGQNYTEGIAVVFKENIAPYKF
 KATMYYKDVTVSQWWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVCRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDME
 LKPKANAATRTSRGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEVADARSVPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGS
 HTEHTSYAADRKFQVQDGFYARDLTTKARATAPTRNLLTPKFTVAWDWVPKPSVCTMKWQEVDMLRSEY
 GGSFRFSSDAISTTFTNLTEYPLSRVDLGDCIGKDARDAMDRIFARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPLL
 SNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNIQRHVNDMLGRVAIACELQ
 NHETLWNEARKLNPNATIASATGRRVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQNSMRISSSPGACYSRPLVSFRY
 EDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEYAYSHQLSRADITVSTFIDLNITMLEDHE
 FVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLRFADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMDLGRAVGKVVMMGI
 VGGVVSAVSGVSSFMSNP [SEQ ID NO: 127] (GenPept gbaAF04615.1).

10 Una secuencia polipeptídica de ectodominio utilizada para fabricar los polipéptidos químéricos de la invención puede encontrarse de forma natural dentro de una proteína de fusión de virus con envoltura, y/o puede tener una o más (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones de aminoácidos individuales (inserciones, delecciones o sustituciones) en relación con una secuencia de proteína de fusión natural. Por ejemplo, se conoce la mutación de las proteínas F para eliminar sus secuencias de escisión por furina, impidiendo de este modo el procesamiento intracelular. El polipéptido de ectodominio puede carecer de uno o más de los dominios SP, TM y C y, opcionalmente, contiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones de aminoácidos individuales (inserciones, delecciones o sustituciones) en relación con una secuencia de proteína de fusión natural.

20 La invención puede utilizar cualquier secuencia deseada de aminoácidos de proteínas de fusión de virus con envoltura, tal como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 127, o una secuencia que tiene identidad o similitud con SEQ ID NO: 2 a 127. Normalmente tendrá al menos el 75 % de identidad o similitud con SEQ ID NO: 2 a 127, por ejemplo, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, de identidad o similitud con SEQ ID NO: 2 a 127.

25 2.3 Construcciones polipeptídicas químéricas representativas

A continuación, se exponen ejemplos no limitativos de polipéptidos químéricos de la presente invención:

2.3.1 Ectodominio de HA de la Inf A - SSM basada en GP160 del VIH

30

MKTIIAFSCILCLIFAQKLPGSDNSMATLCLGHAVPNGLVKTTDDQIEVTNATELVQSS
 STGRICNSPHQILDGKNCTLIDALLGDPHCDDFQNKEWDLFVERSTAYSNCYPYVVDYATLRSLVASSGNLEFT
 QESFNWTGVAQDGSSYACRRGSVNSFFSRLNWLYNLNYKYPEQVNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPGTDKDQTN
 LYVQASGRVIVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVRGVSSIISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIQSGKSSIMRS
 DAHIDECECNSECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPRYVVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG

MVDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAINQITGKLNRVIKKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKID
LWSYNAELLIVALENQHTIDLTDSEMSKLFERTRRQLRENAEDMGNGCFKIHKCDNACIGSIRNGTYDHDIVRN
EALNNRFAQIKGVQLKSGYKDGGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMED
REINNNYTSIHSLSIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 128].

2.3.2 Dominio de tallo de la Ha de la Inf A - SSM basada en GP160 del VIH

MKTIIIALSYILCLVFAQKLPGNNDSTATLCLGHNAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELGFGQ
NTLKLATGMNRNPVEPKTRGIFGAIAGFIENGWEGMLDGWYGFRHQNSEGRGQAAIDLQINGMLNRL
IGSGGSGELLVALLNQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIHKCDNACIGSIRNGTYDHDIVR
DEALNNRFAQIKGVELKSGYKDGGRSQIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMED
WDREINNNYTSIHSLSIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 129].

5

2.3.3 Ectodominio de H5 de la Inf A - SSM basada en GP160 del VIH

MGWSCIILFLVATATGVHSEDOQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKL
COLDGVKPLTLRDCSVAGWLLGNPMCOEFinVPEWSYTVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHLL5RINHFEKIQII
PKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFRNWWLIKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKL
QNPTTYISVGSTLNQRVLVPRIATRSKVNGQSGRMEEFWTILRPNDAINFESNGNFIAPAYKIVKKGDSTIMKS
ELEYGNCNAKCQTPMGAInSSMPFHNTIPLTGECPKIVKSRLVLATGLRNSPQRERRRKRGFLGATAGFIEG
GWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNLSIUDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKM
EDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNNAKELNGCFFYHKCDNECMESVRNGTY
DYPQYSEEARKREEISGVKLESIGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMED
DREINNNYTSIHSLSIEESQNQQPAKDEQUELLE [SEQ ID NO: 130].

10

2.3.4 Ectodominio de HA de la Inf B - SSM basada en GP160 del VIH

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVPLTTPTKSHFANLKG
QTRGKLCNCNFNTDLDVALGRPKCMGNTPSAKVSILHEVKPATSGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTS
NVINTETAPGGPYKVGTSSCPNVANGNGFFNTMAWVIPKDNNTAIPVTVEPYICSEGEdQITVWGFHSDD
KTQMERLYGDSNPQKFTSSANGVTHYVSQLGGFPNQTEDEGLQSGRIVVDMVQKPGKTIVYORGILLPQ
KVVCAASGRSKVIGKSLPLIGEADCLHEKYGLNKSCKPYYTGEHAKAIGNCPIVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKE
RGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGTYSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKLNLYSELEVKNLQRLSGAMNEL
HDEILELDEKVDDLRADETISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCL
DRIAAGTFNAGDFSLPTFDLSNITAASLNDGLDNTGGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
AGGSGGHTWMEDREINNNYTSIHSLSIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 131].

15

2.3.5 Ectodominio de F del RSV - SSM basada en GP160 del VIH

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI
KKNKCNGTDALKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRRFL
GFLLGVGSIAASGVAVSKVLUHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLSDLKNYIDKQLLPIVNIKQSCSI
SNIETVIEFQQKNNRLLITEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPPQAETCKVQSNRV
FCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAVSCYGKTCTASNIKNGRIKTFNSNGCDY
VSNKGVDTVSVGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTNGGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMEDREINNNYTSIHSLSIE
ESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 132].

20

2.3.6 F del RSV (1-520) - SSM basada en GP160 del VIH:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTTSVITIELSNI
 KKNKCNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKTNVTLSKKRKRRL
 GFLLGVGSATASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
 IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSSFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTLPESEVNLNCVDIFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDTVSVGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQP
 AKDEQELLE [SEQ ID NO: 147].

2.3.7 F del RSV (1-520) - Mutaciones DScav - SSM basada en GP160 del VIH:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTTSVITIELSNI
 KKNKCNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKTNVTLSKKRKRRL
 GFLLGVGSATASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
 IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCNTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSSFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTLPESEVNLNCVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDTVSVGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQP
 AKDEQELLE [SEQ ID NO: 150].

5

2.3.8 Ectodominio de F del hMPV - SSM basada en GP160 del VIH

MSWKVVIIFSLIITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCAD
 GPSLIKTEDLTKSALRELRTVSADQUAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTRLESEVTAIKN
 ALKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSNDAGIT
 PAISLDMTDAELARAVSNMPTSAGQQIKMLENRAMVRRKGFGIIGVYGSIVYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAP
 SCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNKEKDCTERGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNPCKV
 STGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGNSNRVGTIKQLNKGSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIK
 GRPVSSSFDPVKFPEDQFNVNALDQVFESIENSQALDQSNSRILSSAEKGNTGGSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLL
 QLTWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE [SEQ ID NO: 133].

10

2.3.9 Ectodominio de F del PIV - SSM basada en GP160 del VIH

MPTSIILLITMMIASFCQIDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFETRYLILSLIPKIEDNSC
 GDQQIKQYKRLLDRLLIPIYDGLRLQKDVKVSNQESNENTDPRTRFFGGVIGTIALGVATSQITAVALVEAKQ
 ARSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSIGNLIVAIKSVQDYVNKEVPSIARLGCEAAGLQLGIALTQHYSELTNIFGD
 NIGSLQEKGTKLQGIAISLYRTNITEIFTSTVDKYDYLFTESIKVRVIDVLDLNDYSITLQVRLPLLTRLNTQIYK
 VDSISYNIQNREWYIPLPSHIMTKGAFLGGADVKECIEAFSSYICPSDPGFVLNHEMESCLSGNISQCPRTVVTSD
 IVPRYAFVNGGVVANCITTCTCNGIGNRINQPPDQGVKIITHKECNTIGINGMLFNTNKEGTLAFYTPNODITLN
 SVALDPIDISIELNKAKSDEESKEWIRRSNQKLDSIGNWHQSSTGGSGIVQQQNNLLRATEAQHQHLLQLTW
 GIKQLQARILAGGSGGGHTTWEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE [SEQ ID NO: 134].

15

2.3.10 Ectodominio de F del MeV - SSM basada en GP160 del VIH

MGLKVNVSIAIFMAVLLTLQPTGQIHWGNLSQLKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLM
 NITLLNNCTRVEIAEYRLLRTVLEPIRDALNAMTQNIQPVQSVASSRRHKRFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIA
 LHQSMLNSQAIDNLRASLETTNQIAIEAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKLGLKLLRYYT

EILSLFGPSLRDPISAEISIQALSYALGGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRGIKARITHVDTESYLIVLSIAYPTLSE
 IKGVIVHRLLEGVSYNIGSQEWYTTVPKYVATQGYLISNFDESSCTFMPREGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGSTKS
 CARTLVSFGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGIIINQDPDKILTYIAADHCPVEVNGVTIQVGSRYPDAV
 YLHRIDLGPILLERLDVGTNLGNATAKLEDAKELLESSDQILRSMKGLSSTGGSGIVQQQNLLRAIEAQHQLLQ
 LTVWGIKQLQARILAGGGGGHTTWMEDREINNYTSIHSIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 135].

2.3.11 Ectodominio de F del HeV - SSM basada en GP160 del VIH

MATQEVRLKCLLCGIIVLVLSEGLGILHYEKLKIGLVKGTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPN
 VSNVSKCTGTVMENYKSRLTGILSPIKGAJELYNNNTHDLVGDVKLAGVVMAIGAIAGIATAAQITAGVALYEAMK
 NADNINKLKSSIESTNEAVVVLQETAEKTVVLTALQDYINTNLVPTIDQISCKQTELALDLALKYLSDLLFVFGP
 NLQDPVNSNSMTIQAIQSQAFGGNYETLRLTGAYATEDFDDLESOSIAGQIVYVDLSSYYIVRVYFPILTEIQQAYV
 QELLPVSFNNNDNSEWISIVPNFVLIRNTLISNIEVKYCLITKSVICNQDYATPMTASVRECLTGSTDKCPRELVVS
 SHVPRFALSQGVLFANCISVTCQCQTGRAISQSGEQTLLMIDNTCTVLGNIISLGKYLGSINYNSESIAVGP
 PVYTDKVDISSQISSMNQSLQQSKDYTEAQKILDVTNPSSGGSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQ
 ARILAGGGGGHTTWMEDREINNYTSIHSIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 136].

5

2.3.12 Ectodominio de F del NiV - SSM basada en GP160 del VIH

MVVILDKRCYCNCILILMISECSVGILHYEKLKIGLVKGTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPN
 VSNMSQCTGSVMENYKTRLNGILTPIKGALEYKNNTNDLVGDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMK
 NADNINKLKSSIESTNEAVVVLQETAEKTVVLTALQDYINTNLVPTIDKISCKQTELALDLALKYLSDLLFVFGP
 NLQDPVNSNSMTIQAIQSQAFGGNYETLRLTGAYATEDFDDLESOSIAGQIVYVDLSSYYIVRVYFPILTEIQQAYQ
 ELLPVSFNNNDNSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCCLITKRSVICNQDYATPMTNNMRECLTGSTEKCPCRELVSS
 HVPRFALSQGVLFANCISVTCQCQTGRAISQSGEQTLLMIDNTCTAVLGNIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGP
 PVYTDKVDISSQISSMNQSLQQSKDYTEAQKILDVTNPSSGGSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQ
 ARILAGGGGGHTTWMEDREINNYTSIHSIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 137].

10

2.3.13 Ectodominio de GP160 del VIH - SSM basada en F del RSV

MRVMGIERNYPCWWTWGIMILGMIIICNTAENLWVTYYGVPIWKDANTTLFCASDAKAY
 DTEVHNWATHACVPTDPSPKELKMENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVQLTPLCVTLDCSYN
 ITNNITNSITNSVNMREEIKNCFSNMTELRDKNRKVYSLFYKLDVVQINNGNNSSNLYRLLINCNTSALTQACPK
 VTFEPPIHYCAPAGYAILKCNDKEFNGTGLCKNVSTVQYTHGIRPVVSTQLLNGSLAEGKVMIRSENITNNVKN
 IIVQLNESVTINCTRPNNTRRSRVRIGPGQTFYATGDTIGDIRQAHCVNSGSQWNKTLHQVVEQLRKYWNNTII
 FNSSSGGDEITTHSFNCAGEFFYCNTSGLNSTWVNGTTSSMSNGTITLPCRIKQIINMWQRVGQAMYAPPIQ
 GVIKCESNITGLLTDGGVNSSDSETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKARRVVEREKRAVTL
 GAVFIGPLTAGSTMGAVSITLTQARKLLSGIVQQSNLLRAIEAQHQHLLKLTWVWGIKQLQARVLVERYLRDQ
 QLLGIWGCGSKLICPTNVPWNSSWSNKSLEIWIENMTWLQWDKEISNYTIKIYELIEESQIQQRNEKDLLEOD
 KWASLWNWFODISKWLWYIKGGGVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKGHHHHGGGFQASIS
 QVNEKINQSLAFIRKSOELLHNV [SEQ ID NO: 138].

15 2.3.14 Ectodominio de GP del EBOV, menos dominio similar a la mucina (1-311,462-650)- SSM basada en GP160 del VIH

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
 LRSVGLNLENGVATDVSATKRWGFRSGVPPKVVNEYAGEWAENCYNLEIKPDGSECUPAAPDGIRGFPRCR
 YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLLPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSG
 YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLE5RFTPQFLLQNETIYTSGKRSNTTGKLIVKVNPEIDTTIGEW

FWETKKNLTRKIRSEELSFTVVGNNNTHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAPKCN
 PNLYWTTQDEAAIGLAWIPYFGPAEGLYIEGLMHNQDGLICLRLQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRK
 AIDFLLQRWGGTCHILGPDCIEPHDWTKNITDKIDQIHDFTDKLTDQGDNDNWWTGWRQGGSGIVQQQN
 NLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEDREINNYTSIHSILIEESQNQQEKNEQUELLE
 [SEQ ID NO: 139].

2.3.15 Ectodominio de GP del MARV, menos dominio similar a la mucina - SSM basada en GP160 del VIH

MKTTCFISLILIQGTKNLPILEIASNNQPQNVDSCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVAD
 SPLEASKRWAFTPRTGVPPKNVEYTEGEAEAKTCYNISVTDPGSKSLLDPPTNIRDYPKCKTIHHIQGQNPHAGIAL
 HLWGAFFLYDRIASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHKMIFRSRQGQGYRHMLTSTNKYWTSSNGTQNTDG
 CFGALQEYNSTKNQTCAPSCKIPPLPTARPEIKLGGAQHLYVFRKRKSILWREGDMFPFLDGLINAPIDFDPVPNT
 KTIFDESSSSGASAEEEDQHASPNISLTLSYFPNINENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLWSWIPFFGPG
 IEGLYTAVLIKQNQNNLVCRLLRRLANQTAKSLELLRVTTTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGGCKVLGPDCIGIEDL
 SKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWWTSDWGGSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILA
 GGSGGGHTTWMEDREINNYTSIHSILIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 140].

5

2.3.16 Ectodominio de S del SARS-CoV - SSM basada en GP160 del VIH

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPPDEIFRSDTLYLTQDLFPLF
 YSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGVWFGSTMNNKSQSIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFF
 AVSKPMGTQTHTMIFDNAPFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHREFVFKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSCF
 NTLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTDAVDCSQNPLAEKCSV
 KSFEIDKGIIYQTSNFRVVPNGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPsvYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKC
 YGVSATKLNDLCFSNVYADSFVVVKGDOVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIADATSTGNINYK
 YRYLRHGKLRRPERDISNVPSPDGKPCPTPALNCYWPLNDYGFYTTGIGYQPYRVVVLSEFELLNAPATVCGPKL
 STDLIKNQCVNFNFNGLGTGTGVLTSSKRFQPFQQFGRVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFCGGVSITPGTNA
 SSEAVLYQDVNCTNSAATHADQLPAWRIYSTGNNVFTQAGCLIGAEHVDTSYECIDIPIGAGICASYHTVSL
 LRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNTIAITNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMICGDSTECANLLQYGSF
 CTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQLPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADGFMK
 QYGECLGNDINARDLICAQKFNGLTVLPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAAALQIPFAMQMAYRFNGIG
 VTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVNNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNIDLSRD
 KVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDGKGYHLMSPQAAPHGV
 VFLHVTYVPSQERNFTTAPACHEGKAYFPREGVFVNGTSWTFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNCVVGIGIINNTV
 YDPLQPELDSDKGELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP
 WYVWGGSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEDREINNYTSIHSILIEES
 QNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 141].

10

2.3.17 Ectodominio de S del MERS-CoV - SSM basada en GP160 del VIH

MHVSFLLMFLPTESYDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIIYPQGR
 TYSNITITYQGLFPYQGDHGDMDYVYSAGHATGTPQKLFVANYSDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTS
 ATIRKIYPAFMLGSSVGNFSQDGKMGRRFNHTLVLPDGCGLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATLPVYD
 CSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTINYDEDEILEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYD
 TIKYYSIIPHISRSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDFSDVGYIRRRAIDCGFNDLSQLHCSYESFDVESGVSVSS
 FEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVNFKRLVFTNCNNLTKLSSLFVNDFTCSQISPAAIASNCYSSL
 LDYFSYPLSMKSDLGVSSAGPISQFNYKQSFSNPTCLLATVPHNLTITKPLKYSINKCSRLLSDDRTEVPQLVN
 ANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQLSPLEGGGWLVASGSTVAMTEQLQMFGITVQYGTDTNSVCPLKEFAN
 DTKIASQLGNCEVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVRQQRFVYDAYQNLVGYYSDDGNYYCLRACVSVPSVYDKE

TKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDT
 PSTLTPRSVRSVPGELEMRLASIAFNHPIQVDQFNSSYFKLSIPTNSFGVTQEYIQTTIQKVTVDCKQYICNGFQKC
 EQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLFAVKSSQSSPIPGFGGDFNLTLLEPVISTGSRSARSAIEDL
 LFDKVTIADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSSLGSIAGVGWTAGLSS
 FAAIPFAQSIFYRLNGVGITQQVLSENQKLIAKFNQALGAMQTGFTTTNEAFRKVQDAVNNNAQALSKLASELS
 NTFGAISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTNAFVAQQLVRSESAALSAQAKDVNECVKAQSKRSGF
 CGQGTHIVSFVNVAPNGLYFMHVYPPSNHIEVVSAYGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNTRIVDEWSYTGSSF
 YSPEPITSLNKYVAPQVTVQNIESTNLPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKVNSTSIPNFGSLTQINTTLLDLTYEMLS
 QVVKALNESYIDLKELGNYTYYNKWPWYIWLGSSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGS
 GHHTWMEDREINNYTSIHSILIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 142].

2.3.18 Ectodominio de G del VSV - SSM basada en GP160 del VIH

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVPHNQKGNWKVPSNYHCPSSSDLNWHNDLIGTAIQVK
 MPKSHKAIQADGWMCHASKWVTCDFRHYGPKYITQSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPQFPQQSCGYA
 TVTDAEAVIVQVTPHHVLDDEYTGEGWDSQFINGKCSNYICPTVHNSTIWHSDYKVKGCDNSN15MDITFFSE
 DGEISSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQ
 TSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNGTGPFTAINGTLKYFETRYIRVIAAPILSR
 MVGMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFPLYMIGHGMQLSDOLHLSSKAQVFEHPHIQDAAS
 QLPDESLLFGOTGLSKNPIELVEGWFSWKGSSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGS
 GHHTWMEDREINNYTSIHSILIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 143].

5

2.3.19 Ectodominio de GP del RABV - SSM basada en GP160 del VIH

MIPQTLLFVPLLVSLSLCFGKFPITYIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLGFSYM
 ELKVGYISAIVKVNGETCTGVTEAETYNTFVGYVTTFKRKHFRPTDACRAAYNWKMGDPRYEESLHNYPDY
 HWLRTVKTTKESLVIISPSVSDLPYDKSLHSRVFPGKCSGITVSSTYCPTNHDTIWMPPENPRLGTSCDIFTNS
 RGKRASKGSKTCGFVDERGLYKSLKGACKLKGVLGLRLMDGTWAAIQTSDEAKWCPPDQLVNHDFRSDEI
 EHLVVEELVKKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGKAYTIFNKTLMEAADAHYKSVRTWNEIIPSKGC
 LRGGRCHPHVNGVFFNGILGPDGHLIPEMQSSLLQQHMELESSVIPLMHPLADPSTVFKDGDDEADFVEVH
 LPDVHKQVSGVDSLGLPSWGKGSSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGS
 GHHTWMEDREINNYTSIHSILIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 144].

10

2.3.20 Ectodominio de Gb del HSV1 - SSM basada en GP160 del VIH

MRQGAPARGRRWFVVAALLGLTLGVLVSAAPSSPGTPGVAATQAANGPATPAPPAP
 GAPPTGDPKPKKNKKPKPKPPRPGDNATVAAGHATLREHLRIKAENTDANFYVCPPPTGATVQFEQPRRC
 TRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFATMYYKDVTVSQVWFGRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINA
 KGVCRS
 TAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTSRGWHTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEV
 DARSVYP
 YDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHTENTSYAADRFKQVDFYARDLTTKARATAPTTRNLLTPKFTV
 AWDWV
 PKRPSVCTMTKWQEVDCLRSEYGGSFRFSSDAISTTFTNLTEYPLSRVLDLGCIGKDARDAMDRIFARRYNA
 THIKVGQPQYIYLANGGFLIAYQPLSNTLAEIYVREHLREQSRKPPNPTPPPGASANASVERIKTSSIEFARLQF
 TYNHIQRHVNDMLGRVATAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRPVSARMLGDVM
 AVSTCVPVAADNV
 IVQNSMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVY
 FEYAYS
 HQLSRADITVSTFIDLNITMLEDHEPVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLRFADIDTV
 IHADANAAMF
 AGLGAFFEGMGLGRAVGKVVVMGIVGGVVS
 AVSGVSSFMSNPGGSGIVQQQNLLRAIEAQHQHLLQLTVWG
 I
 KQLQARILAGGS
 GHHTWMEDREINNYTSIHSILIEESQNQQEKNEQUELLE [SEQ ID NO: 145].

15 2.4 Uso de la fracción estabilizadora de la estructura como dominio universal de oligomerización

Además de su utilidad en la estabilización de un polipéptido de ectodominio de la invención frente al reordenamiento a una conformación posfusión, la fracción estabilizadora de la estructura es útil como dominio de oligomerización universal (UOD) para oligomerización en oligómeros de cualquier molécula heteróloga de interés, en particular, los

trímeros. Un UOD puede fusionarse aguas arriba o aguas abajo de una molécula proteica heteróloga para formar un polipéptido quimérico. Normalmente, el UOD se fusiona aguas abajo de la molécula proteica heteróloga. Como en las realizaciones de ectodomios descritas en el presente documento, la asociación de las repeticiones en héptada complementarias del UOD entre sí en condiciones adecuadas para su asociación (por ejemplo, en solución acuosa) da como resultado la formación de un haz de dos hélices antiparalelas que se trimeriza para formar un haz de seis hélices altamente estable, permitiendo así la trimerización del polipéptido quimérico para formar un complejo polipéptido trimérico.

La molécula proteica heteróloga puede ser un polipéptido natural o no natural. El polipéptido heterólogo puede ser o comprender un polipéptido terapéutico. Una gran diversidad de polipéptidos terapéuticos, incluidos tanto los ligandos como los receptores, son conocidos en la técnica por ser útiles para tratar diversas enfermedades. En la Tabla 8 se muestran diversos ejemplos de dianas e indicaciones conocidas para polipéptidos terapéuticos.

TABLA 8

DIANA PEPTÍDICA	INDICACIÓN	NOMBRE/EMPRESA
	Oncología	
Receptor GNRH	Tratamiento paliativo del cáncer de próstata	Leuprorelina/Takeda
		Histrelina/Valera
		Goserelina/AstraZeneca
Antagonista de CXCP4	Movilizadores de células madre, NHL, MM, carcinoma hepatocelular	Mozobil/AnorMED Inc (ahora Genzyme)
		CTCE-9908/ Chemokine Therapeutics
Antagonista de la integrina alfa-V/beta 3	Cabeza y Cuello, glioblastoma	Cilengitide/Merck
Antagonista de la cinasa receptora de angiopoyetina	Carcinoma de células de mama, ovario, renales	AMG-386
		pepticuerpo/Amgen,Takeda
Antagonista de IGF1-R	Carcinoma hepatocelular	Allostera Pharmaceuticals
Receptor del péptido liberador de gastrina bFGF	Inflamación, Cáncer, Antiangiogénesis varios tipos de cáncer	Academic
Inhibidor de gelatinasa	Cáncer	CTT Technologies
Agonista de GCSFP	Neutropenia	Gematide/Affymax
TFG de queratinocitos	Mucositis	Keratide/Affymax
Receptor de VEGF-R2/c-met	Cáncer	Dipéptido de Dyax
	Autoinmune	
TPO	ITP	Pepticuerpo Nplate/Amgen
Análogo de GLP-2	Enterocolitis de Crohn	Teduglutida/NPS Allelix
Treg	MS	Copaxone/Teva
Agonistas de GPCR	Varios	Compugen
	Diabetes	
Análogos de GLP-1/Agonistas de R		GLP-1 (7-37)/Biorexis Pfizer
		Exenatida/Amilina
		Liraglutida/Novo Nordisk
		ZP10/Zelanda
		Pharma/Sanofi-Avanetis
		Pramilinitida/Amylin
Péptido proislet		CureDM
Antagonistas del glucagón		Glucagón
	Obesidad	PYY/múltiples empresas
		Oxintomodulina TKS-1225/Thiakis/Wyeth
Oxintomodulina EPO	Enfermedad renal crónica anémica	Hematida/Affimax

(continuación)

DIANA PEPTÍDICA	INDICACIÓN	NOMBRE/EMPRESA
Receptor PH de la calcitonina	Osteoporosis	Capsitonina/Bone Medical Teriparatida/Lilly
	Cardiovascular	
BNP	Insuficiencia cardíaca congestiva	Nesiritida/Scios
antagonista de GPIIb/IIIa	Infarto de miocardio	Eptifibatida/COR Therapeutics/Schering Plough
Inhibidor de la trombina	Trombosis, Insuficiencia cardíaca isquémica	Bivalirudina/TMC/Scherrer
Antagonista de la bradicinina B2	Angioedema hereditario	Icatibant/Hoechst
Modulador de unión de GAP	Arritmia cardiaca	Rotigaptida/Zealand/Wyeth
Agonista de FPLRG1	Lesión por reperfusión	CompuGen
BNP/APN	Insuficiencia cardíaca congestiva	Bispecific/Academic
	Acromegalia	
Agonista del receptor de somatostatina	Acromegalia y cáncer neuroendocrino	Octreotida/Valera
		Pharmaceuticals Lanreotide/lbsen
	Enuresis	
Agonista de la vasopresina V1		Desmopresina/Orphan
		Sustancias terapéuticas/Lipresina
		Terlipresina/Orphan Therapeutics
	Parto	
Antagonista de la oxitocina	Detiene el parto prematuro	Retosiban/GSKj Atosiban/Ferring
	Antiviral	
Bloqueador de la proteína de fusión del VIH	VIH	Enfuvirtida/Roche
Inmunoestimulador	HepC, HepC	Timalfasina/RegeneRx SCV-07/SciClone
Antagonista de CXCP4	VIH	AnorMED Inc (ahora Genzyme)
Antagonista de CCRS	VIH	
Biespecífico CXCR4/CCRS	VIH	Genzyme
	Antibacteriano	
	<i>Staph. aureus</i>	Daptamicina Bacitracina
Oftálmica		Gramidicina/Bausch&Lomb Colistina
		Pexiganan
		Omiganan
		Xoma-629
Antagonista de la glicoforina	Malaria	Academic
	SNC	
Antagonista del transportador de norepinefrina	Dolor crónico intenso	Conotoxina/Xenoma
	Antidepresivo	Nemifitida
Agonistas/antagonistas del receptor de formil péptido tipo 1	EPOC	Diversos estudios, Patente de Bayer 2003
Receptor de procincicina-1 y-2 antagonista de IL4/IL13	Asma	Synairgen Academic

El UOD puede utilizarse para crear receptores solubles trimerizados que incluyen, por ejemplo, miembros de la superfamilia de receptores del TNF, miembros de la superfamilia de la Ig, miembros de la superfamilia de receptores de citocinas, miembros de la superfamilia de receptores de quimiocinas, miembros de la familia de las integrinas, familia de receptores del factor de crecimiento, receptores hormonales, receptores opioides, otros receptores de neuropéptidos, canales iónicos, entre otros, incluyendo CD1a, CD2 (LFA-2), CD2R, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD4-7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, COWI2, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD15u, CD16a (FcγRIIIA), CD16b

(FcγRIIIB), CDw17, CD18 (Integrina β2), CD19-28, CD29 (Integrina β1), CD30, CD31 (PE-CAM-1), CD32 (FcγRII), CD33 (Siglec-3), CD34-41, CD42a-d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RO, DC47, CD47R, CD48, CD49a-f (VLA-1-6), CD50 (ICAM-3), CD51, CD52, CD53, CD54 (ICAM-1), CD55, CD56 (N-CAM), CD57, CD58 (LFA-3), CD59, CD60a-c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a-f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, DC83, CDw84, CD85, CD86-CD91, CDw92, CD93, CD94-CD99, CD99R, CD100-CD106, CD107a, CD107b, CD108-CD112, CDw113, CD114 (G-CSFR), CD115 (M-CSFR), CD116, CD117, CD118, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a (IL-1R tipo I), CDw121b (IL-1R, tipo II), CD122 (IL-2Rβ), CDw123 (IL-3R), CD124 (IL-4R), CDw125 (IL-5R), CD126 (IL-6R), CD127 (IL-7R), CDw128, CDw128b (IL-8Rβ), CD129 (IL-9R), CD130 (IL-6Rβ), CDw131, CD132, CD133, CD134 (Ox-40), CD135-CD139, CD140a (PDGFRα), CD140b (PDGFRβ), CD141-CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD15, CD151, CD152 (CTLA-4), CD153 (CD30L), CD154 (CD40L), CD155, CD156a-c, CD157, CD158a, CD158b, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD162R, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD178 (FasL), CD179a, CD179b, CD180, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD184 (CXCR4), CD185 (CXCR5), CDw186 (CXCR6), CD191 (CCR-1), CD192 (CCR2), CD193 (CCR3), CD194 (CCR4), CD195 (CCR5), CD196 (CCR6), CD197 (CCR7), CDw198 (CCR8), CDw199 (CCR9), CD200 (Ox-2), CD201, CD202b, CD203c, CD204 (secuestradores de macrófagos R), CD207 (Langerina), CD208 (DC-LAMP), CD209 (DC-SIGN), CDw210 (IL-10R), CD212 (IL-12-Rβ1), CD213a1 (IL-13-Rα1), CD213a2 (IL-13-Rα2), CDw217 (IL-17-R), CDw218a (IL-18Rα), CDw218b (IL-18Rβ), CD220 (Insulina-R), CD221 (IGF-1R), CD222 (IGF-II R), CD223-234, CD235a (glicoforina A), CD235ab (glicoforina A/B), CD235b (glicoforina B), CD236 (glicoforina C/D), CD236R (glicoforina C), CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241-CD249, CD252 (Ox40L), CD254 (RANKL), CD256 (APRIL), CD257 (BAFF), CD258 (LIGHT), CD261 (TRAIL-R1), CD262 (TRAIL-R2), CD263 (DcR1), CD264 (DcR2), CD256 (RANK), CD266 (TWEAK-R), CD267 (TACI), CD268 (BAFFR), CD269 (BCMA), CD271 (NGFR), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD275 (B7-H2), CD276 (B7-H3), CD277, CD278 (ICOS), CD279 (PD1), CD280, CD281 (TLR1), CD282 (TLR2), CD283 (TLR3), CD284 (TLR4), CD289 (TLR9), CD292, CDw293, CD294, CD295 (LeptinaR), CD296, CD297, CD298 (subunidad β3 de la Na+/K+-ATPasa), CD299 (L-SIGN), CD300a, CD300c, CD300e, CD301-CD307, CD309 (VEGF-R2), CD312, CD314-322, CD324, CDw325, CD326, CDw327, CDw328, CDw329, CD331-CD337, CDw338, CD339, B7-H4, Xedar, CCR10, CX3CR1, receptor similar a la quimiocina-1 (ChemR23), receptores del complemento, DARC, IL-11R, IL-12R, IL-13R, IL-15R, IL-20R, IL-21R, IL-22R, IL-23R, IL-27R, IL-28R, IL-31R, XCR1, CX3CR1, proteína de unión a quimiocinas 2 (D6), receptores de interferón, familia de receptores similares a Ig asociados a leucocitos, familia de receptores similares a la inmunoglobulina leucocitaria, incluyendo LILRC1 y LILRC2, receptores de leucotrienos, LAMP, proteínas similares a la nectina 1-4, IgSF8, familia de transcritos similares a inmunoglobulinas LT1-6, EDAR, factor derivado del estroma (SDF), receptor de linfopoyetina del estroma tímico, receptor de eritropoyetina, receptor de trombopoyetina, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGF1-4, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF-R), epaCAM, receptores del factor de crecimiento similares a la insulina IGF1-R e IGF2-R, fibronectina, proteínas de transmembrana ricas en leucina de la fibronectina FLRT1-3, Her2, 3 y 4, CRELD1 y 2, 8D6A, receptor de lipoproteínas (LDL-R), miembros de la familia de las lectinas de tipo C, tales como CLEC-1, CLEC-2, CLEC4D, 4F y Dectina 1 y 2, lailina, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de la hormona liberadora de prolactina (PRRP), receptores de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR), receptor de la hormona foliculoestimulante (FSHR), receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (GNRHR), receptor de la hormona liberadora de tirotropina (TRHR), receptores de somatostatina SSTR1-SSTR5, receptores de vasopresina 1A, 1B, 2, receptor de oxitocina, receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina (LHCGR), receptor de tirotropina, receptor del factor natriurético auricular NPR1-3, receptores de acetilcolina (AchR), receptor de calcitonina (CT), Receptores de colecistocinina CCKAR y CCKBR, receptores de péptidos intestinales vasoactivos VPAC1 y 2, receptores de δ-opioides, receptores de κ-opioides, receptores de μ-opioides, σ receptores σ 1 y σ, receptores de cannabinoides R1 y 2, receptores de angiotensina AT1-4, receptores de bradicinina V1 y 2, receptor de taquicinina 1 (TACR1), receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR), receptores de galanina R1-3, receptores neuropeptídicos GPCR neuropeptido B/W R1 y 2, receptores de neuropeptídios FF R1 y R2, receptor del neuropeptido S R1, receptores del neuropeptido Y Y1-5, receptores de neurotensina, receptores de activina de tipo I y II, cinasas similares a los receptores de activina (Alk-1 y Alk-7), betaglicano, inhibidor de BMP y Activina unido a membrana (BAMBI), cripto, receptores de Trk TrkA, TrkB, TrkC, Familia de receptores de AXL, Familia de receptores de LTK, TIE-1, TIE-2, Ryk, Neuropilina 1, receptores de Eph EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6, receptores de melanocortina MC-3 y MC-4, AMICA, CXADR, proteína de unión a la hormona liberadora de corticotropina, molécula asociada a linfocitos T de Clase I restringida, CMHI, CMHII, gen y ORF inducidos por ampoterina (AMIGOs), APJ, receptores de asialoglucoproteína 1 y 2 (ASGPR), inhibidor de la angiogénesis específica a cerebro 3 (BAI-3), molécula de adhesión celular basal/glucoproteína del grupo sanguíneo Lutheran (BCAM/Lu), cadherinas, COCP1, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística MRP-7, condrolectina, surfactina pulmonar, claudinas, ANTHXR2, colágenos, receptores del complemento, contactinas 1-6, cubulina, endoglicano, EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial), Receptor endotelial de la proteína C (EPCR), receptores de Eph, receptores de péptidos similares al glucagón GLP-1R y 2R, receptores de glutamato, transportadores de glucosa, receptor de glicina, glicanos, receptor de ácidos biliares acoplado a la proteína G, receptor acoplado a la proteína G 15, miembros de la familia de KLOTHO, receptor de leptina, LIMPPII, LINGO, NOGO, receptor hialurónico endotelial de vasos linfáticos 1 (LYVE-1), receptor inhibidor mieloide similar a la lectina C CLEC12A, neogenina, nefrina, NETO-1, NETO-2, receptor de NMDA, molécula de adhesión celular de unión a opioides, proteína relacionada con la lectina inhibidora de osteoclastos, receptor de oncostatina, receptor asociado a los osteoclastos, osteoactivina, receptores de trombina, podoplanina, porimina,

- canales de potasio, Pref-1, receptor del factor de células madre, semaforinas, SPARC, receptor secuestrador A1, estabilinas, sindecanos, receptores de linfocitos T, TCAM-1, receptor de citocinas de linfocitos T TCCR, trombospondinas, TIM1-6, receptores tipo Toll, receptores desencadenantes expresados en células mieloídes (TREM) y proteínas similares a TREM, TROP-2 o cualquier mimético o análogo de la misma.
- 5 De manera adicional, el UOD puede utilizarse para trimerizar ligandos de cualquiera de los receptores anteriores, incluyendo, por ejemplo, los miembros de la superfamilia TNF, miembros de la superfamilia de las citocinas, factores de crecimiento, miembros de la superfamilia de las quimiocinas, factores proangiogénicos, factores proapoptóticos, integrinas, hormonas y otros factores solubles, entre otros, incluyendo RANK-L, Linfoxina (LT)- α , LT- β , LT- α 1 β 2, zLIGHT, BTLA, TL1A, FasL, TWEAK, CD30L, 4-1BB-L (CD137L), CD27L, OX40L (CD134L), GITRL, CD40L (CD154), APRIL (CD256), BAFF, EDA1, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17F, IL-17A/F, IL-18, IL-1g, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IFN-gamma, IFN-alfa, IFN beta, TNF- α , TNF- β , G-CMF, GM-CSF, TGF- β 1, 2 y 3, TGF- α , cardiotrofina-1, factor inhibidor de leucemia (LIF), betacelulina, anfirregulina, linfofotina del estroma tímico (TSLP), flt-3, CXCL1-16, CCL1-3, CCL3L1, CCL4-CCL8, CCL9/10, CCL11-28, XCL1, XCL2, CX3CL1, HMG-B1, proteínas de choque térmico, chemerina, defensinas, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), oncostatina M, limitina, factores de crecimiento endotelial vascular VEGF A-D y PIGF, factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino, eritropoyetina, trombopoyetina, factor de crecimiento derivadas de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos FGF1-14 y 16-23, factor de crecimiento derivado del hepatoma, hepassocina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factores de crecimiento similares a la insulina IGF1 e IGF2, proteínas de unión a IGF (IGFBP 1-6), GASPS (proteínas séricas asociadas a factores de crecimiento y diferenciación), factor de crecimiento del tejido conjuntivo, epigen, epiregulina, arterias del desarrollo y factor de crecimiento epidérmico de la cresta neural (DANCE), factor de maduración glial- β , insulina, hormona del crecimiento, angiogenina, angiopoyetina 1-4, proteínas similares a la angiopoyetina 1-4, integrina α V β 3, α V β 5 y α 5 β 1, eritropoyetina, trombopoyetina, hormona liberadora de prolactina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de tirotropina, somatostatina, vasopresina, oxitocina, demoxitocina, carbetocina, hormona luteinizante (LH) y gonadotropinas coriónicas, hormona estimulante de la tiroides, ANP, BNP, CNP, calcitonina, CCK a, CCK B, péptidos intestinales vasoactivos 1 y 2, encefalina, dinorfina, β -endorfina, morfina, 4-PPBP, [1] SA 4503, Ditolilguanidina, angiotensina siramesina, calidina, bradicinina, taquicininas, sustancia P, calcitonina, galanina, neurotensina, neuropéptidos Y1-5, neuropéptido S, neuropéptido FF, neuropéptido B/N, factores neurotróficos derivados del cerebro BDNF, NT-3, NT-4/5, activina A, AB, B y C, inhibina, hormona inhibidora mülleriana (MIH), proteínas morfogénicas óseas BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP15, factor de diferenciación del crecimiento GDF1, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, Miostatina/GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF15, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotropina-3 (NT-3), y neurotropina-4 (NT-4), artemina, persefina, neurturina, GDNF, agrina, ligandos de efrina EFNA1, EFNA2, EFNA3, EFNA4, EFNA5, EFNB1, EFNB2, EFNB3, adiponectina, α 2-macroglobulina, agrecano, proteína relacionada con el agutí (AgRP), hormona estimulante de α -melanocitos, albúmina, ameloblastina, plasminógeno, angiotatina, apolipoproteína A1, AII, B, B100, E, amiloide, autofagina, proteína Ig H3 inducida por TGF-beta), biglicano, quimiotaxina LECT2 derivada de células leucocitarias, 40 proteína C-reactiva, componentes del complemento, cordina, proteínas similares a las del cordón umbilical, collectinas, proteína similar a la clusterina 1, cortisol, factor van willebrandt, citostatinas, endostatina, endorepelina, ligandos de efrina, fetuinas, ficolinas, glucagón, granulisina, gremlina, inhibidores del activador del HGF HAI-1 y 2, calilcreinas, lamininas, leptinas, lipocalinas, lectina de unión a manano (MBL), meteorina, MFG-E8, lectina específica a galactosa N-acetil-galactosamina de macrófagos (MGL), midquina, miocilina, nestina, factor 2 específico de los osteoblastos, 45 osteopontina, osteocrina, osteoadherina, pentraxina, persefina, factor de crecimiento placentario, relaxinas, resistina y moléculas similares a la resistina, factor de células madre, estaniocalcinas, VE-estatina, sustancia P, tenascinas, vitronectina, factor tisular, inhibidores de la vía del factor tisular, así como cualquiera de las >7.000 proteínas identificadas en el secretoma humano que figuran en la base de datos de proteínas secretadas (Chen Y et al., 2005. *Nucleic Acids Res* 33 Database Issue:D169-173), o cualquier mimético o análogo de la misma.
- 50 Adicionalmente, el UOD puede utilizarse para trimerizar enzimas tales como, por ejemplo, las enzimas convertidoras de angiotensina (ACE), metaloproteasa de matriz, metaloproteasas ADAM con motivo trombospondina tipo I (ADAMTS1, 4, 5, 13), aminopeptidasas, enzimas de escisión de APP de sitio beta (BACE-1 y -2), quimasa, calilcreinas, reolina, serpinas, o cualquier mimético o análogo de las mismas.
- 55 También, el UOD puede utilizarse para trimerizar agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas para aumentar la potencia de compuestos dirigidos con fines terapéuticos, tales como, por ejemplo, la caliqueamicina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina difterica, ricina, saporina, péptidos inductores de apoptosis o cualquier análogo de los mismos.
- 60 El UOD también puede utilizarse para fusionar抗ígenos para vacunas contra el cáncer, de tal manera que, por ejemplo, el antígeno A33 del cáncer colorrectal, α -fetoproteína, mucina 1 (MUC1), CDCP1, moléculas de adhesión celular del antígeno carcinoembionario, Her-2, 3 y 4, mesotelina, CDCP1, NETO-1, NETO-2, sindecanos, LewisY, CA-125, antígeno asociado a melanoma (MAGE), tirosinasa, antígeno tumoral epitelial (ETA), entre otros, así como para fusionar抗ígenos de la envoltura viral o抗ígenos fúngicos para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

2.5 Métodos de preparación de construcciones polipeptídicas químéricas

- Los polipéptidos químéricos de la presente invención pueden prepararse por síntesis química o medios recombinantes.
- 5 Habitualmente, los polipéptidos químéricos se preparan mediante la expresión de una construcción recombinante que codifica el polipéptido químérico en células hospedadoras adecuadas, aunque puede utilizarse cualquier método adecuado. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, células de insecto (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*), células de mamíferos (por ejemplo, primate humano o no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato, y roedor (por ejemplo, hámster), células aviares (por ejemplo, pollo, pato y ganso), bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus spp.*), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*), células de *Tetrahymena* (es decir, *Tetrahymena thermophile*) y combinaciones de los mismos. Muchas células de insecto y de mamífero son bien conocidas en la técnica. Las células de insecto adecuadas incluyen, por ejemplo, linfocitos Sf9, linfocitos Sf21, linfocitos Tn5, Schneider S2, y células High Five (un aislado clonal derivado de la línea celular parental de *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen)). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK293, normalmente transformadas por ADN fragmentado de adenovirus de tipo 5), linfocitos NIH-3T3, linfocitos 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito de la CEACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células fetales de pulmón de rhesus (ATCC CL-160), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón canino Madin-Darby ("MDCK") (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de hámster bebé (BHK), tales como BHK21-F, células HKCC y similares. Las células aviares adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EB^x®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, células de pato (por ejemplo, líneas celulares AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en *Vaccine* 27:4975-4982 (2009) y el documento WO2005/042728), células EB66 y similares.
- 30 Sistemas de expresión de células de insecto adecuados, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin n.º 1555 (1987). Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en forma de kit en, entre otros, Invitrogen, San Diego Calif. Los sistemas de expresión de células aviares también son conocidos por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.340.740, 5.656.479, 5.830.510, 6.114.168; y 6.500.668; la patente europea N.º EP 0787180B; la solicitud de patente europea N.º EP03291813.8; los documentos WO 03/043415; y WO 03/076601. De manera similar, los sistemas de expresión de células bacterianas y de mamíferos también son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, *Yeast Genetic Engineering* (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, Londres.
- 40 Las construcciones recombinantes que codifican los polipéptidos químéricos de la presente invención pueden prepararse en vectores adecuados para usar métodos convencionales. Una serie de vectores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes en células de insectos o mamíferos son bien conocidos y convencionales en la técnica. Los vectores adecuados contienen una serie de componentes, que incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen marcador seleccionable; uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador), y/o una o más señales de traducción; y una secuencia señal o secuencia líder para dirigirla a la ruta secretora en una célula hospedadora seleccionada (por ejemplo, de origen mamífero o de una especie heteróloga mamífera o no mamífera). Por ejemplo, para la expresión en células de insecto puede utilizarse un vector de expresión de Baculovirus adecuado, tal como pFastBac (Invitrogen), para producir partículas recombinantes de baculovirus. Las partículas de baculovirus se amplifican y se utilizan para infectar células de insecto y expresar proteínas recombinantes. Para la expresión en células de mamíferos, se utiliza un vector que impulsará la expresión de la construcción en la célula hospedadora de mamífero deseada (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).
- 55 Los polipéptidos químéricos pueden purificarse utilizando cualquier método adecuado. Los métodos adecuados para purificar las proteínas deseadas incluyen la precipitación y varios tipos de cromatografía, tales como una interacción hidrófoba, intercambio iónico, afinidad, quelantes y de exclusión por tamaño son bien conocidos en la técnica. Pueden crearse esquemas de purificación adecuados utilizando dos o más de estos o otros métodos adecuados. Si se desea, los polipéptidos químéricos pueden incluir una fracción de purificación o "etiqueta" que facilite la purificación, como se describe en la Sección 2.1.2. Dichos polipéptidos con etiqueta pueden purificarse convenientemente, por ejemplo, de medios acondicionados, mediante cromatografía quelante o cromatografía de afinidad.
- 60 Los polipéptidos químéricos pueden incluir secuencias adicionales. Por ejemplo, con fines de expresión, el péptido líder natural de un polipéptido heterólogo de interés (por ejemplo, el péptido líder natural de una proteína de fusión de un virus con envoltura) puede sustituirse por otro diferente.
- 65 **3. Construcciones de ácido nucleico para la producción endógena de polipéptidos químéricos**

La presente invención también contempla construcciones de ácido nucleico para la producción endógena de polipéptidos químéricos en un organismo hospedador, adecuadamente un animal vertebrado, preferentemente un mamífero tal como un ser humano). Las construcciones de ácido nucleico pueden ser vectores/replicantes extracromosómicos autorreplicantes (por ejemplo, plásmidos) o vectores que se integran en un genoma hospedador.

5 Las construcciones de ácido nucleico pueden ser vectores virales. Vectores virales ilustrativos incluyen los vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de poxvirus, vectores de virus vaccinia, vectores de adenovirus, vectores de virus asociados a adenovirus, vectores de virus del herpes, vectores de flavivirus y vectores de alfavirus. Los vectores virales pueden estar vivos, atenuados, pueden ser de replicación condicional o de replicación deficiente, y normalmente es un vector viral no patógeno (defectuoso), competente para la replicación.

10 A modo de ejemplo, cuando el vector viral es un vector de virus vaccinia, un polinucleótido que codifica un polipéptido químérico de la invención puede insertarse en un sitio no esencial del genoma de un vector viral de vaccinia. Se describen dichos virus no esenciales, por ejemplo, en Perkus et al. (1986. *Virology* 152:285; Hruby et al. (1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3411); Weir et al. (1983. *J. Virol.* 46:530). Los promotores adecuados para su uso con virus

15 vaccinia incluyen, aunque no de forma limitativa, P7.5 (véase, por ejemplo, Cochran et al. 1985. *J. Virol.* 54:30); P11 (véase, por ejemplo, Bertholet, et al., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2096); y CAE-1 (véase, por ejemplo, Patel et al., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9431). Las cepas de vaccinia altamente atenuadas son más aceptables para su uso en humanos e incluyen Lister, NYVAC, que contiene delecciones genómicas específicas (véase, por ejemplo, Guerra et al., 2006. *J. Virol.* 80:985-998); Tartaglia et al., 1992. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8:1445-1447), o MVA (véase, por ejemplo, Gheradi et al., 2005. *J. Gen. Virol.* 86:2925-2936); Mayr et al., 1975. *Infection* 3:6-14). Véase también Hu et al. (2001. *J. Virol.* 75:10300-10308), donde se describe el uso de un virus de la enfermedad de tipo Yaba como vector para la terapia del cáncer); patente de EE. UU. N.º 5.698.530 y 6.998.252. Véanse también, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.443.964. Véanse también las patentes de EE. UU. N.º 7.247.615 y 7.368.116.

20 25 Puede usarse un vector de adenovirus para expresar un polipéptido químérico de interés. El adenovirus en el que puede basarse un vector de transferencia viral puede ser de cualquier origen, cualquier subgrupo, cualquier subtipo, mezcla de subtipos o cualquier serotipo. Por ejemplo, un adenovirus puede ser del subgrupo A (por ejemplo, serotipos 12, 18 y 31), subgrupo B (por ejemplo, serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35 y 50), subgrupo C (por ejemplo, serotipos 1, 2, 5 y 6), subgrupo D (por ejemplo, serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, y 42-48), subgrupo E (por ejemplo, serotipo 4), subgrupo F (por ejemplo, serotipos 40 y 41), un serogruppo no clasificado (por ejemplo, serotipos 49 y 51), o cualquier otro serotipo adenoviral. Los serotipos adenovirales del 1 al 51 están disponibles en la "American Type Culture Collection" (ATCC, Manassas, Va.). Los adenovirus no del grupo C, e incluso adenovirus no humanos, pueden utilizarse para preparar vectores adenovirales deficientes en replicación. Vectores adenovirales no del grupo C, métodos de producción de vectores adenovirales no del grupo C, y métodos de utilización de vectores adenovirales no del grupo C se divulan en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.801.030, 5.837.511 y 5.849.561, y las solicitudes internacionales de patente WO 97/12986 y WO 98/53087. Cualquier adenovirus, incluso un adenovirus químérico, puede utilizarse como fuente del genoma viral para un vector adenoviral. Por ejemplo, un adenovirus humano puede utilizarse como fuente del genoma viral para un vector adenoviral de replicación deficiente.

30 35 40 45 50 55 60 Los vectores virales basados en el virus del herpes simple (HSV) también son adecuados para la producción endógena de los polipéptidos químéricos de la invención. Muchos vectores del HSV deficientes en replicación contienen una delección para eliminar uno o más genes intermedios-tempranos para impedir la replicación. Las ventajas del vector herpes son su capacidad para entrar en una fase latente que puede dar lugar a una expresión de ADN a largo plazo, y su gran genoma de ADN viral que puede albergar ADN exógeno de hasta 25 kb. Para una descripción de los vectores basados en HSV, véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.837.532, 5.846.782, 5.849.572 y 5.804.413, y las solicitudes internacionales de patente WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 y WO 99/06583.

Los vectores virales basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la leucemia del gibón (GaLV), retrovirus ecotrópicos, virus de la inmunodeficiencia del simio (SW), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones (véase, por ejemplo, Buchscher et al., 1992. *J. Virol.* 66:2731-2739; Johann et al., 1992. *J. Virol.* 66:1635-1640; Sommerfelt et al., 1990. *Virology* 176:58-59; Wilson et al., 1989. *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller et al., 1991. *J. Virol.* 65:2220-2224; Miller et al., 1990. *Mol. Cell Biol.* 10:4239; Kolberg, 1992. *NIH Res.* 4:43; Cornetta et al., 1991. *Hum. Gene Ther.* 2:215).

El vector retroviral puede ser un vector lentiviral. Como entenderá el experto en la materia, un vector viral, tal como un vector lentiviral, se refiere generalmente a una partícula de vector viral que comprende el genoma del vector viral. Por ejemplo, una partícula de vector lentiviral puede comprender un genoma de vector lentiviral. Con respecto a los vectores lentivirales, el genoma del vector puede derivarse de cualquiera de un gran número de adecuados vectores lentivirales basados en el genoma disponibles, incluidos los identificados para aplicaciones de terapia génica humana (véase, por ejemplo, Pfeifer et al., 2001. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211). Los genomas de vectores lentivirales adecuados incluyen aquellos basados en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), VIH-2, el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de anemia infecciosa equina, el virus de inmunodeficiencia simia (SIV) y el virus maedi/visna. Una característica deseable de los lentivirus es que pueden infectar tanto las células en división como las que no se dividen, aunque las células diana no necesitan ser células en división ni ser estimuladas para dividirse. Generalmente, el genoma y las glucoproteínas de la envoltura se basarán en diferentes virus, de tal manera que la partícula del vector viral resultante se somete a pseudotipificación. Es deseable que el vector viral incorpore características de seguridad. Las características de seguridad incluyen la autoinactivación de LTR y la deficiencia de integración como se describe con más detalle en el presente documento. La deficiencia de integración puede ser conferida por elementos del genoma del vector pero también puede derivarse de elementos del sistema de empaquetamiento (es decir, una proteína integrasa no funcional que puede no formar parte del genoma del vector pero que se suministra en trans). Los vectores ilustrativos contienen una señal de empaquetamiento (psi), un elemento de respuesta a Rev (RRE), donante de corte y empalme, aceptor de corte y empalme, opcionalmente un tracto central polipuríno (cPPT), y un elemento WPRE. El genoma viral del vector comprende secuencias de un genoma lentiviral, tales como el genoma del VIH-1 o el genoma del SIV. La construcción del genoma viral puede comprender secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus y, en particular, puede comprender las secuencias R y U5 de 5' LTR de un lentivirus y una 3' LTR inactivada o autoinactivada de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR del VIH, SIV, FIV o BIV. Normalmente, las secuencias LTR son secuencias LTR del VIH.

El genoma del vector puede comprender una LTR 3' inactivada o autoinactivada (véase, por ejemplo, Zufferey et al., 1998. *J. Virol.* 72; 9873; Miyoshi et al., 1998. *J. Virol.* 72:8150). Un vector autoinactivador generalmente tiene una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la repetición terminal larga (LTR) 3', que se copia en la 5' LTR durante la integración de vectores. En un caso, el elemento U3 de la 3' LTR contiene una delección de su secuencia potenciadora, la caja TATA, Spl y NF-kappa B. Como resultado de la autoinactivación de la 3' LTR, el provirus que se genera después de la entrada y la transcripción inversa comprenderá una 5' LTR inactivada. Lo lógico es mejorar la seguridad al reducir el riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR en los promotores celulares cercanos. La 3' LTR autoinactivadora se puede construir por cualquier método conocido en la técnica.

Opcionalmente, la secuencia U3 de la 5' LTR lentiviral se puede reemplazar con una secuencia promotora en la construcción viral, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título de virus recuperado de la línea celular de empaquetamiento. También se puede incluir una secuencia potenciadora. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN viral en la línea celular de empaquetamiento. En un ejemplo, se utiliza la secuencia potenciadora/promotora del CMV (véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.385.839 y 5.168.062).

El riesgo de mutagénesis por inserción se minimiza mediante la construcción del vector lentiviral para que sea defectuoso en la integración. Se puede seguir una variedad de enfoques para producir un genoma del vector no integrante. Estos enfoques implican diseñar una(s) mutación(es) en el componente de enzima integrasa del gen *pol*, de tal manera que codifique una proteína con una integrasa inactiva. El genoma del vector en sí puede modificarse para evitar la integración, por ejemplo, mediante mutación o delección uno o ambos sitios de unión, o haciendo que la 3' LTR -tracto de polipurína proximal (PPT) no sea funcional mediante delección o modificación. Igualmente, hay disponibles enfoques no genéticos; éstos incluyen agentes farmacológicos que inhiben una o más funciones de la integrasa. Los enfoques no son mutuamente excluyentes, es decir, se puede usar más de uno a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden no ser funcionales, o la integrasa y el sitio PPT pueden no ser funcionales, o los sitios de unión y el sitio de PPT pueden no ser funcionales, o todos ellos pueden no ser funcionales.

Los vectores de lentivirus ilustrativos se describen, por ejemplo, en las publicaciones de EE. UU. N.º 20150224209, 20150203870, 20140335607, 20140248306, 20090148936 y 20080254008.

Los vectores virales también pueden basarse en un alfavírus. Los alfavírus incluyen el virus Sindbis (y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV)), virus Aura, virus Babanki, virus del bosque de Barmah, virus Bebaru, virus Cabassou, virus del chikungunya, virus de la encefalitis equina del este, virus de los Everglades, virus de Fort Morgan, virus Getah, virus Highlands J, virus de Kyzylagach, virus de Mayaro, virus Me Tri, virus de Middelburg, virus de Moss das Pedras, virus de Mucambo, virus Ndumu, virus O'nyong-nyong, virus Pixuna, virus de Río Negro, virus del río Ross, virus de la enfermedad del páncreas del salmón, virus del bosque Semliki (SFV), virus del elefante marino del sur, virus de Tonate, virus Trocara, virus Una, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental y virus Whataroa. Generalmente, el genoma de dichos virus codifica proteínas no estructurales (por ejemplo, replicón) y estructurales (por ejemplo, cápside y envoltura) que pueden traducirse en el citoplasma de la célula hospedadora. El virus del río Ross, virus Sindbis, SFV y VEEV se han utilizado para desarrollar vectores de

transferencia viral para la administración de transgenes. Los virus pseudotipados pueden formarse combinando glucoproteínas de envoltura alfavirales y cápsides retrovirales. Pueden encontrarse ejemplos de vectores alfavirales en las publicaciones de EE. UU. N.º 20150050243, 20090305344 y 20060177819.

- 5 Como alternativa, los vectores virales pueden basarse en un flavivirus. Los flavivirus incluyen el *virus de la encefalitis japonesa*, el *virus del dengue* (por ejemplo, *Dengue-1*, *Dengue -2*, *Dengue -3*, *Dengue -4*), *virus de la fiebre amarilla*, *virus de la encefalitis del valle del Murray*, *virus de la encefalitis de San Luis*, *virus del Nilo Occidental*, *virus de Kunjin*, *virus de la encefalitis de Rocio*, *virus Ilhéus*, *virus de la encefalitis transmitida por garrapatas*, *virus de la encefalitis centroeuropea*, *virus de la encefalitis siberiana*, *virus de la encefalitis rusa de primavera-verano*, *virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur*, *virus de la fiebre hemorrágica de Omsk*, *virus de la encefalomielitis ovina*, *virus de Powassan*, *virus de Negishi*, *virus de Absettarov*, *Virus de Hansalova*, *virus Apoi* y *virus Hypr*. Pueden encontrarse ejemplos de vectores de flavivirus en las publicaciones de EE. UU. N.º 20150231226, 20150024003, 20140271708, 20140044684, 20130243812, 20120294889, 20120128713, 20110135686, 20110014229, 20110003884, 20100297167, 20100184832, 20060159704, 20060088937, 20030194801 y 20030044773.
- 10
- 15 **4. Complejos polipeptídicos químéricos**

Los polipéptidos químéricos de la invención pueden autoensamblarse en condiciones adecuadas para formar complejos polipeptídicos químéricos. Por consiguiente, la presente invención abarca además un método para producir un complejo polipeptídico químérico, en donde el método comprende: combinar polipéptidos químéricos de la presente invención en condiciones (por ejemplo, en solución acuosa) adecuadas para la formación de un complejo polipeptídico químérico, de modo que se produzca un complejo polipeptídico químérico que comprenda tres polipéptidos químéricos y se caracterice por un haz de seis hélices formado por las estructuras superhélice de las respectivas fracciones estabilizadoras de la estructura de los polipéptidos químéricos. Los polipéptidos químéricos que se combinan pueden ser idénticos o no idénticos para formar de este modo homotrímeros y heterotrímeros, respectivamente.

Generalmente, los polipéptidos químéricos se autoensamblan en una solución acuosa tamponada (por ejemplo, pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9). Si se requiere, pueden utilizarse condiciones de desnaturalización suaves, tales como, incluyendo la urea, pequeñas cantidades de disolventes orgánicos o calor para desnaturalizar ligeramente los polipéptidos químéricos con el fin de facilitar el replegamiento y el autoensamblaje.

En el método puede utilizarse cualquier preparación adecuada de polipéptidos químéricos. Por ejemplo, los medios de cultivo celular acondicionados que contienen el polipéptido químérico deseado pueden utilizarse en el método. Sin embargo, se prefiere utilizar polipéptidos químéricos purificados en el método.

35 En realizaciones particulares en las que la fracción estabilizadora de la estructura se utiliza para la oligomerización de polipéptidos de ectodominio para formar complejos polipeptídicos químéricos, las subunidades polipeptídicas de ectodominio de los complejos se encuentran en la conformación de prefusión. Sin desear estar sujeto a ninguna teoría o modo de operación, se cree que la forma de prefusión del trímero de polipéptido de ectodominio se estabiliza en los 40 complejos descritos en el presente documento debido a que la fracción estabilizadora de la estructura heteróloga induce la formación de complejos e impide que las fracciones o dominios internos del polipéptido de ectodominio (por ejemplo, las regiones HRA y HRB de un polipéptido de ectodominio de Clase I, o la superhélice central de α-hélice y el bucle o bucles de fusión en la región C-terminal de un ectodominio de Clase III) interactúen. La interacción de estas fracciones o dominios internos da lugar a un nuevo replegamiento en la forma posterior a la fusión.

45

5. Método de selección sistemática

En el presente documento, también se describe, pero no se reivindica, los métodos de cribado de agentes que se unen preferentemente de forma específica a una proteína de fusión de un virus con envoltura, y/o a un complejo de la proteína de fusión. Se puede analizar una biblioteca de compuestos para ver si se unen a un polipéptido químérico que contenga un ectodominio de fusión de virus con envoltura, o a un complejo de la misma.

55 Los agentes candidatos incluyen numerosas clases químicas, de tal manera que incluyen moléculas pequeñas como compuestos orgánicos pequeños y macromoléculas tales como péptidos, polipéptidos y polisacáridos. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente puentes de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, deseablemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los compuestos candidatos pueden comprender estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas o estructuras aromáticas o polaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas 60 incluyendo, pero sin limitación: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroideos, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. La biblioteca de compuestos puede comprender compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Como alternativa, o además, la biblioteca de compuestos puede incluir compuestos naturales o producidos sintéticamente.

65 Los métodos para determinar si un agente se une a una proteína diana y/o la afinidad de un agente por una proteína diana son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la unión de un agente a una proteína diana se puede detectar y/o

cuantificar utilizando diferentes técnicas tales como, pero sin limitación, interferometría de Biocapa (BLI), transferencia Western, transferencia puntual, resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos AlphaScreen® o AlphaLISA®, o métodos basados en espectrometría de masas.

- 5 Los agentes pueden ensayarse utilizando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la interacción del agente con el polipéptido quimérico que contiene ectodominio, o complejo de la invención. En los métodos descritos en el presente documento puede utilizarse cualquier instrumento de SPR disponible en el comercio incluyendo, pero sin limitación, instrumentos BIACore (Biacore AB; Uppsala, Suecia); instrumentos 1Asys (sensores de afinidad; Franklin, Massachusetts); Sistema 10 IBIS (Windsor Scientific Limited; Berks, Reino Unido), sistemas SPR-CELLIA (Nippon Laser and Electronics Lab; Hokkaido, Japón) y el detector SPR Spreeta (Texas Instruments; Dallas, Tex.). Véase, por ejemplo, Mullett et al. (2000) *Methods* 22: 77-91; Dong et al. (2002) *Reviews in Mol Biotech* 82: 303-323; Fivash et al. (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9: 97-101; y Rich et al. (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11: 54-61.
- 15 Las interacciones biomoleculares entre los agentes y el polipéptido quimérico que contiene polipéptido de ectodominio o el complejo de la invención pueden ensayarse utilizando BLI en un Octet (ForteBio Inc.). La BLI es una técnica analítica óptica sin etiqueta que detecta la unión entre un ligando (tal como un polipéptido quimérico que contiene polipéptido de ectodominio o un complejo de la invención) que está inmovilizado en una punta de biosensor y un analito (tal como un compuesto de ensayo) en solución midiendo el cambio en el grosor de la capa de proteína en la 20 punta del biosensor en tiempo real.

Los ensayos AlphaScreen (PerkinElmer) pueden utilizarse para caracterizar la unión de agentes de prueba al polipéptido quimérico que contiene polipéptido de ectodominio o al complejo de la invención. Las siglas ALPHA corresponden a Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (ensayo homogéneo de proximidad de 25 luminiscente amplificado). AlphaScreen es un ensayo de proximidad basado en microesferas que detecta la unión entre moléculas (tal como un polipéptido quimérico del sujeto, o un complejo y un compuesto de prueba) unidas a microesferas donantes y aceptoras midiendo la señal producida por la transferencia de energía entre las microesferas donantes y aceptoras. (Véase, por ejemplo, Eglen et al. (2008) *Curr. Chem. Genomics* 1:2-10).

30 Pueden utilizarse ensayos AlphaLISA® (PerkinElmer) para caracterizar la unión de agentes de ensayo al polipéptido quimérico o complejo de la invención. AlphaLISA es una modificación del ensayo AlphaScreen descrito anteriormente para incluir microesferas aceptoras que contiene europio y funciona como alternativa a los ensayos ELISA tradicionales. (Véase, por ejemplo, Eglen et al. (2008) *Curr. Chem. Genomics* 1:2-10.)

35 Se puede utilizar la diversidad de técnicas de inmunoensayo, entre las que se incluyen los inmunoensayos competitivos y no competitivos. El término "inmunoensayo" abarca técnicas que incluyen, sin limitación, citometría de flujo, FACS, inmunoensayos enzimáticos (EIA), tal como la técnica de inmunoanálisis múltiple enzimático (EMIT), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC ELISA) e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA), además inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA), 40 radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA), inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA) y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, dichos inmunoensayos pueden automatizarse. Los inmunoensayos también se pueden usar junto con fluorescencia inducida por láser. Los inmunoensayos de liposomas, tales como inmunoensayos de liposomas por inyección de flujo e inmunosensores de liposomas, también son adecuados para su uso en la presente invención. Igualmente, los ensayos de nefelometría, en los que, por ejemplo, la formación de complejos de proteína/anticuerpo da como resultado un aumento de la dispersión de la luz que se convierte en una señal de velocidad máxima en función de la concentración del marcador, son adecuados para su uso 45 en los métodos de la presente invención.

50 La unión de los agentes de prueba al polipéptido quimérico o complejo en cuestión puede probarse utilizando métodos de termodesnaturalización que implican fluorimetría diferencial de barrido (DSF) y dispersión estática diferencial de la luz (DSLS).

La unión de los agentes de prueba al polipéptido quimérico o complejo de la invención puede probarse utilizando un 55 método basado en la espectrometría de masas tal como, pero sin limitación, una plataforma de selección por afinidad acoplada a espectrometría de masas (AS-MS). Se trata de un método sin etiqueta donde se incuban la proteína y el compuesto de prueba, las moléculas no unidas se lavan y los complejos proteína-ligando se analizan por MS para la identificación del ligando tras una etapa de descomplejación.

60 La unión de los agentes de prueba al polipéptido quimérico o complejo en cuestión puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas detectables tales como las radiomarcadas (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^{3}H), fluorescentemente marcadas (por ejemplo, FITC), o polipéptido o complejo quimérico marcado enzimáticamente o compuesto de prueba, por inmunoensayo, o por detección cromatográfica.

65 También se contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la medición, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido o complejo quimérico y un compuesto de prueba.

Todas las realizaciones anteriores son adecuadas para su desarrollo en plataformas de alto rendimiento.

5 Los compuestos pueden seguir probándose en los modelos animales para identificar los que tiene los efectos *in vivo* más potentes, por ejemplo, los que se unen específicamente a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión y preferentemente estimulan o potencian un efecto terapéuticamente útil, por ejemplo, carga viral reducida, infección o síntomas asociados a la misma reducidos. Estas moléculas pueden servir como "compuestos principales" para el desarrollo ulterior de productos farmacéuticos, por ejemplo, sometiendo los compuestos a modificaciones secuenciales, modelado molecular y otros procedimientos rutinarios empleados en el diseño racional de fármacos.

10

6. Moléculas de unión a antígeno

15 Los polipéptidos y complejos químéricos que contienen ectodomios de la presente invención son útiles para producir moléculas de unión a antígenos, que son preferentemente proteínas (es decir, "proteína de unión a antígeno") que son inmunointeractivas con una proteína de fusión de virus con envoltura. Los polipéptidos y complejos químéricos que contienen ectodominio incluyen al menos un epítopo de prefusión que no está presente en la forma de posfusión de la proteína de fusión del virus con envoltura y, por lo tanto, son útiles para preparar moléculas de unión a antígeno que sean inmunointeractivas con una forma metaestable o de prefusión de una proteína de fusión del virus con envoltura.

20

25 Los expertos en la materia apreciarán la base de conocimientos bien desarrollada sobre las proteínas de unión a antígenos, tal como se expone, por ejemplo, en Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 6^a ed., W.B. Saunders Company (2010) o Murphrey et al., *Janeway's Immunobiology*, 8^a ed., Garland Science (2011).

30 35 En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos que son inmunointeractivas con los polipéptidos y complejos químéricos de la presente invención son anticuerpos. Los anticuerpos incluyen anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se ha descrito en la sección de la definición. Un anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo completa (incluida las versiones policlonales, monoclonales, químéricas, humanizadas o versiones humanas que tienen cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa), o comprende un fragmento de unión a antígeno de la misma. Fragmentos de anticuerpo incluyen F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc y Fd, y pueden incorporarse en anticuerpos de dominio único, anticuerpos monocatenarios, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136). También se incluyen los polipéptidos de anticuerpos tales como se ha descrito en la patente de EE. UU. N.º 6.703.199, incluyendo los monocuerpos de polipéptidos de fibronectina. Otros polipéptidos de anticuerpos se divulan en la publicación de Patente de EE. UU. N.º 2005/0238646, que son polipéptidos monocatenarios.

40 En la técnica se conocen numerosos métodos de preparación de anticuerpos contra antígenos de interés. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra los polipéptidos y complejos químéricos de la presente invención pueden fabricarse utilizando métodos convencionales de hibridoma que a menudo se basan en el método seminal de Kohler, G. et al. (1975, *Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*, *Nature* 256:495-497 o una modificación del mismo. Normalmente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en especies no humanas, tales como ratones. En general, se utiliza un ratón o una rata para la inmunización, pero también se pueden utilizar otros animales. Los anticuerpos pueden producirse inmunizando ratones con una cantidad inmunogénica de un inmunógeno, en este caso un polipéptido o complejo químérico de la presente invención. El inmunógeno se puede administrar varias veces a intervalos periódicos tales como, cada quince días o cada semana, o puede administrarse de tal manera que se mantenga la viabilidad en el animal.

45

50 Para monitorear la respuesta de anticuerpos, se puede obtener una pequeña muestra biológica (por ejemplo, sangre) del animal y probar el título de anticuerpos contra el inmunógeno. El bazo y/o varios ganglios linfáticos grandes se pueden extirpar y disociar en células individuales. Si se desea, las células del bazo se pueden cribar (después de eliminar las células adherentes no específicamente) aplicando una suspensión celular a una placa o un pocillo recubierto con el antígeno. Linfocitos B, que expresan inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa y no se enjuagarán con el resto de la suspensión. Los linfocitos B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, a continuación, se pueden fusionar con células de mieloma (por ejemplo, X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif.). Se puede usar polietilenglicol (PEG) para fusionar el bazo o los linfocitos con las células del mieloma para formar un hibridoma. A continuación, el hibridoma se cultiva en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, también conocido como "medio HAT"). A continuación, los hibridomas resultantes se siembran en placas mediante dilución limitante y se prueban para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al inmunógeno, usando, por ejemplo, FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) o cribado inmunohistoquímico (IHC). A continuación, los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales seleccionados se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo tisular o reactores de fibra hueca), o *in vivo* (por ejemplo, como ascitis en ratones).

55

60 65 Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, los linfocitos B inmortalizados por el virus de Epstein-Barr (VEB)

pueden utilizarse para producir anticuerpos monoclonales inmunointeractivos con un polipéptido o complejo químérico del sujeto. Los hibridomas se expanden y subclonian, si se desea, y en los sobrenadantes se prueba la actividad antiinmunógena mediante procedimientos de ensayo convencionales (por ejemplo, FACS, IHC, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, inmunoensayo de fluorescencia, etc.).

5 Por tanto, la presente invención contempla además métodos de producción de una molécula de unión a antígeno que sea inmunointeractiva con una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: (1) inmunizar un animal con un complejo o composición polipeptídica químérica, como se ha descrito anteriormente y en cualquier otro sitio del presente documento, en donde un polipéptido de ectodomio 10 del complejo polipeptídico químérico corresponda a la proteína de fusión del virus con envoltura; (2) aislar un linfocito B del animal, que sea inmunointeractivo con la proteína de fusión o el complejo de la misma; y (3) producir la molécula de unión a antígeno expresada por ese linfocito B. La presente invención abarca también las moléculas de unión a antígenos que se producen por dichos métodos, así como los derivados de las mismas. También abarca células que 15 incluyen hibridomas capaces de producir las moléculas de unión a antígeno de la invención, y métodos para producir moléculas de unión a antígeno desde esas células. En realizaciones específicas, las moléculas de unión a antígeno producidas por los métodos de la invención son preferentemente moléculas de unión a antígeno neutralizantes.

También se contemplan los anticuerpos químéricos y los anticuerpos humanizados. Un anticuerpo monoclonal humanizado puede comprender el dominio variable de un anticuerpo murino (o todo o parte del sitio de unión a 20 antígeno del mismo) y un dominio constante derivado de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de dominio variable (que carece del sitio de unión a antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales modificados genéticamente incluyen los descritos en Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323, Liu et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:3439, Larrick et al., 1989, 25 *BioTechnology* 7:934 y Winter et al., 1993, *TIPS* 14:139. El anticuerpo químérico puede ser un anticuerpo injertado con CDR. Las técnicas para humanizar anticuerpos se analizan en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.869.619, 5.225.539, 5.821.337, 5.859.205, 6.881.557, Padlan et al., 1995, *FASEB J.* 9:133-39, Tamura et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1432-41, Zhang, W., et al., *Molecular Immunology* 42(12):1445-1451, 2005; Hwang W. et al., *Methods* 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua W F, et al., *Methods* 36(1):43-60, 2005; y Clark, M., *Immunology Today* 21(8):397-397-30 402, 2000.

Un anticuerpo puede ser también un anticuerpo monoclonal totalmente humano. Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos pueden generarse mediante cualquier número de técnicas con las que estarán familiarizadas los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, transformación por el virus de Epstein Barr (EBV) 35 de células de sangre periférica humanas (por ejemplo, que contienen linfocitos B), inmunización *in vitro* de linfocitos B humanos, fusión de células del bazo de ratones transgénicos inmunizados que portan genes de inmunoglobulina humana insertados, aislamiento a partir de bibliotecas de fagos de la región V de la inmunoglobulina humana, u otros procedimientos como se conoce en la técnica y basados en divulgación del presente documento.

40 Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos monoclonales humanos en animales no humanos. Por ejemplo, se han preparado ratones en los que se han inactivado uno o más genes de inmunoglobulina endógenos por diversos medios. Se han introducido genes de inmunoglobulinas humanas en los ratones para reemplazar los genes de ratón inactivados. En esta técnica, elementos del locus humano de las cadenas pesada y ligera se introducen en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones dirigidas de los loci 45 endógenos de las cadenas pesada y ligera (véase también Bruggemann et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58 (1997)). Por ejemplo, los transgenes de inmunoglobulina humana pueden ser miniconstrucciones génicas o transloci en cromosomas artificiales de levadura, que sufren reordenamiento del ADN e hipermutación específicas de los linfocitos B en el tejido linfoide del ratón.

50 Los anticuerpos producidos en el animal incorporan cadenas polipeptídicas de inmunoglobulinas humanas codificadas por el material genético humano introducido en el animal. Un animal no humano, tal como un ratón transgénico, puede inmunizarse con un inmunógeno del polipéptido o complejo químérico del sujeto.

Ejemplos de técnicas para la producción y uso de animales transgénicos para la producción de anticuerpos humanos 55 o parcialmente humanos se describen en las patentes de EE. UU. N.º 5.814.318, 5.569.825 y 5.545.806, Davis et al., Production of human antibodies from transgenic mice in Lo, ed. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Humana Press, NJ:191-200 (2003), Kellermann et al., 2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97, Russell et al., 2000, *Infect Immun.* 68:1820-26, Gallo et al., 2000, *Eur J. Immun.* 30:534-40, Davis et al., 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25, Green, 60 1999, *J. Immunol Methods* 231:11-23, Jakobovits, 1998, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:33-42, Green et al., 1998, *J. Exp. Med.* 188:483-95, Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7:607-14, Tsuda et al., 1997, *Genomics* 42:413-21, Mendez et al., 1997, *Nat. Genet.* 15:146-56, Jakobovits, 1994, *Curr Biol.* 4:761-63, Arbones et al., 1994, *Immunity* 1:247-60, Green et al., 1994, *Nat. Genet.* 7:13-21, Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-58, Jakobovits et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551-55. Chen, J., M. et al. *Int. Immunol.* 5 (1993): 647-656, Choi et al., 1993, *Nature Genetics* 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, *Nature Biotech.* 14: 845-51, Harding et al., 1995, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies* en *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, Lonberg et al., 1995, *Int.*

- Rev. Immunol. 13: 65-93, Neuberger, 1996, Nature Biotech. 14: 826, Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, Int. Immunol. 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97: 722-27, Tuailon et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90: 3720-24, y Tuailon et al., 1994, J. Immunol. 152: 2912-20.; Lonberg et al., Nature 368:856, 1994; Taylor et al., Int. Immunol. 6:579, 1994; 5 patente de EE. UU. N.º 5.877.397; Bruggemann et al., 1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovits et al., 1995. Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35. Igualmente, los protocolos que implican el XenoMouse®. (Abgenix, ahora Amgen, Inc.) se describen, por ejemplo, en los documentos U.S. 05/0118643 y WO 05/694879, WO 98/24838, WO 00/76310 y la patente de EE. UU. N.º 7.064.244.
- 10 La presente invención abarca además fragmentos de un anticuerpo polipéptido/complejo antiquimérico de la presente invención. Dichos fragmentos pueden consistir completamente en secuencias derivadas de anticuerpos o pueden comprender secuencias adicionales. Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos de dominio. Se proporcionan otros ejemplos en Lunde et al., 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06.
- 15 15 Los anticuerpos monocatenarios pueden formarse uniendo fragmentos de dominio variable de cadena pesada y ligera (región Fv) a través de un puente de aminoácidos (enlazador peptídico corto), dando como resultado una cadena polipeptídica única. Dichos Fv monocatenarios (scFv) se han preparado fusionando el ADN que codifica un enlazador peptídico entre los ADN que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes pueden plegarse sobre sí mismos para formar monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros y tetrameros), dependiendo de la longitud de un enlazador flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Al combinar diferentes polipéptidos que comprenden V_L y V_H, se pueden formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos monocatenarios incluyen las descritas en la Patente de EE. UU. N.º 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:379-87.
- 20 25 También pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno derivados de un anticuerpo, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo, por ejemplo, digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros de acuerdo con los métodos convencionales. A modo de ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol para producir fragmentos 3.5S Fab' monovalentes. Opcionalmente, la reacción de escisión se puede llevar a cabo utilizando un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que se obtienen como resultado de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática utilizando papaína produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, patente de EE. UU. N.º 4.331.647, Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., en Methods in Enzymology 1:422 (Academic Press 1967); y por Andrews, S. M. y Titus, J. A. en Current Protocols in Immunology (Coligan J. E., et al., eds.), John Wiley & Sons, Nueva York (2003), páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10A.1-2.10A.5. También se pueden utilizar otros métodos para la escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera (Fd), la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700

de anticuerpo o a un fragmento del mismo. Por tanto, por ejemplo, un dominio V_H que está presente en el dominio de región variable puede estar unido a un dominio CH1 de inmunoglobulina, o a un fragmento del mismo. Igualmente, un dominio V_L puede unirse a un dominio C_K o a un fragmento del mismo. De esta manera, por ejemplo, el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en donde el dominio de unión a antígeno contiene dominios asociados V_H y V_L unidos covalentemente en sus extremos C a un dominio CH1 y C_K , respectivamente. El dominio CH1 puede ampliarse con más aminoácidos, por ejemplo, para proporcionar una región bisagra o una porción de un dominio de región bisagra tal como se encuentra en un fragmento Fab', o para proporcionar otros dominios, tales como los dominios CH2 y CH3 de los anticuerpos.

10 **7. Composiciones**

La presente invención proporciona además composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido o complejo químérico, o una construcción de ácido nucleico a partir de la cual es expresable el polipéptido o complejo químérico, como se ha descrito anteriormente y en cualquier otro sitio del presente documento. Las composiciones representativas pueden incluir un tampón, que se selecciona de acuerdo con el uso previsto del polipéptido o complejo químérico, y puede incluir también otras sustancias apropiadas para el uso previsto. Cuando el uso previsto sea inducir una respuesta inmunitaria, la composición se denomina "inmunogénica" o "inmunomoduladora". Dichas composiciones incluyen composiciones preventivas (es decir, composiciones administradas con el fin de impedir una afección tal como una infección) y composiciones terapéuticas (es decir, composiciones administradas con el fin de tratar afecciones tales como una infección). Por lo tanto, puede administrarse una composición inmunomoduladora a un receptor con fines profilácticos, de mejora, paliativos o terapéuticos.

25 Los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente un tampón adecuado, del cual se conoce una amplia diversidad en la técnica, adecuado para un uso previsto. En algunas ocasiones, la composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, del cual se conoce una diversidad en la técnica y no es necesario analizar en el presente documento. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en una diversidad de publicaciones, que incluyen, por ejemplo, A. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds 7^a ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3^a ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

30 35 Las composiciones pueden comprender más de un (es decir, diferente) polipéptido o complejo químérico de la invención (por ejemplo, polipéptidos químéricos cuyos respectivos polipéptidos de ectodomínio corresponden a diferentes proteínas de fusión de virus con envoltura), o una o más construcciones de ácido nucleico desde las que es/son expresable(s) el(s) polipéptido(s) o complejo(s) químérico(s).

40 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en una forma adecuada para su administración por inyección, en una formulación adecuada para la ingestión oral (tal como, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, cápsulas, elixires), en forma de un ungüento, crema o loción adecuada para administración tópica, en una forma adecuada para su administración como colirio, en forma de aerosol adecuado para su administración por inhalación, tal como por inhalación intranasal u oral, o en una forma adecuada para la administración parenteral, es decir, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.

45 50 También pueden incorporarse principios activos supplementarios, tales como adyuvantes o modificadores de la respuesta biológica, a las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aunque pueden incluirse adyuvante(s) en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, no necesitan comprender necesariamente un adyuvante. En dichos casos, pueden evitarse los problemas de reactogenicidad derivados del uso de adyuvantes.

55 En general, la actividad adyuvante en el contexto de una composición farmacéutica de la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, una capacidad de potenciar la respuesta inmunitaria (cuantitativa o cualitativamente) inducida por componentes inmunogénicos de la composición (por ejemplo, un polipéptido químérico o complejo de la presente invención). Esto puede reducir la dosis o el nivel de los componentes inmunogénicos necesarios para producir una respuesta inmunitaria y/o reducir el número o la frecuencia de las inmunizaciones necesarias para producir la respuesta inmunitaria deseada.

60 Puede incluirse cualquier polímero hidrófobo adecuado en una composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, puede utilizarse un adyuvante a base de aluminio. Los adyuvantes adecuados a base de aluminio incluyen, pero sin limitación, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y combinaciones de los mismos. Otros ejemplos específicos de adyuvantes a base de aluminio que pueden utilizarse se describen en la patente europea n.º 1216053 y en la patente de EE. UU. N.º 6.372.223. Otros adyuvantes adecuados incluyen el adyuvante incompleto de Freund y el adyuvante completo (Laboratorios Difco, Detroit, Mich.); Adyuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, Pa); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; lípido monofosforil A y quil A; emulsiones de aceite en agua, incluidas las descritas en la patente europea n.º 0399843, la

patente de EE. UU. N.º 7.029.678 y la publicación PCT N.º WO 2007/006939; y/o adicionalmente citocinas, tales como GM-CSF o interleucina-2, -7, o -12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) monofosforil lípido A (MPL), toxina del cólera (TC) o su subunidad constitutiva, enterotoxina termolábil (LT) o su subunidad constitutiva, adyuvantes del ligando del receptor tipo Toll, como el lipopolisacárido (LPS) y derivados de los mismos (por ejemplo, lípido monofosforil A y lípido monofosforil A 3-deacilado), NS1 de *Flavivirus* y muramil dipéptido (MDP).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden suministrarse en un kit. El kit puede comprender componentes adicionales para ayudar a realizar los métodos de la presente invención, tales como, por ejemplo, dispositivo(s) de administración, tampón(es) y/o diluyente(s). Los kits pueden incluir recipientes para alojar los diversos componentes e instrucciones de utilización de los componentes del kit en los métodos de la presente invención.

8. Dosis y vías de administración

La composición se administra en una "cantidad eficaz" es decir, una cantidad eficaz para lograr un objetivo previsto en un sujeto. La dosis de compuesto(s) activo(s) administrada a un paciente debe ser suficiente para lograr una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, tal como una reducción de al menos un síntoma asociado a una infección. La cantidad o la frecuencia de las dosis del(de los) compuesto(s) farmacéuticamente activo(s) que se van a administrar puede depender del sujeto que se va a tratar, incluida la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud del mismo. A este respecto, las cantidades precisas del(de los) compuesto(s) activo(s) para la administración dependerán del criterio del médico al cargo. Un experto en la materia podría, mediante experimentación habitual, determinar una cantidad eficaz, no tóxica de un polipéptido o complejo químérico descrito en el presente documento para incluir en una composición farmacéutica de la presente invención para el resultado terapéutico deseado.

En general, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse de manera compatible con la vía de administración y las características físicas del receptor (incluido el estado de salud) y de tal manera que provoque el efecto o efectos deseados (es decir, terapéuticamente eficaz, inmunogénica y/o protectora). Por ejemplo, la dosis adecuada de una composición farmacéutica de la presente invención puede depender de diversos factores que incluyen, pero sin limitación, las características físicas de un sujeto (por ejemplo, la edad, el peso, el sexo), si el compuesto se utiliza como agente único o como terapia adyuvante, el tipo de restricción del CMH del paciente, la progresión (es decir, el estado patológico) de una infección vírica, y otros factores que pueden ser reconocidos por un experto en la materia. Se describen diversas consideraciones generales que pueden tenerse en cuenta a la hora de determinar una dosis adecuada de una composición farmacéutica de la presente invención, por ejemplo, en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; y Gilman et al., (Eds.), (1990), Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, Pergamon Press.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido o complejo químérico del sujeto, o una construcción de ácido nucleico a partir de la cual se expresa el polipéptido o complejo químérico, puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto profiláctico o terapéutico deseado, por ejemplo, reducir un síntoma asociado a la infección y/o reducir el número de agentes infecciosos en el individuo. En estos casos, una cantidad eficaz reduce un síntoma asociado a la infección y/o reduce el número de agentes infecciosos en un individuo en al menos el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % o más, en comparación con el síntoma o el número de agentes infecciosos en un individuo no tratado con el polipéptido o complejo químérico. Síntomas de infección por un organismo patógeno, así como métodos de medición de dichos síntomas, se conocen en la técnica. Los métodos para medir el número de organismos patógenos en un individuo son los convencionales en la técnica.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido o complejo químérico del sujeto, o una construcción de ácido nucleico a partir de la cual se expresa el polipéptido o complejo químérico, puede ser una cantidad que sea eficaz en una vía de administración seleccionada para provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de virus con envoltura.

Por ejemplo, donde el polipéptido químérico comprende un antígeno heterólogo, una "cantidad eficaz" puede ser una cantidad que sea eficaz para facilitar la provocación de una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Por ejemplo, donde el antígeno heterólogo es un antígeno de un organismo patógeno diferente de aquel del que se deriva el polipéptido de ectodomínio), una "cantidad eficaz" de un polipéptido o complejo químérico del sujeto, o una construcción de ácido nucleico a partir de la cual se expresa el polipéptido o complejo químérico, es una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria contra ese antígeno y, preferentemente, para proteger al hospedador contra la infección o los síntomas asociados a la misma, por ese organismo patógeno. Una cantidad eficaz puede reducir un síntoma asociado a la infección por el organismo patógeno y/o reducir el número de agentes infecciosos correspondientes al organismo patógeno en un individuo en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % o más, en comparación con el síntoma o el número de agentes infecciosos en un individuo no tratado con el polipéptido o complejo químérico. Síntomas de infección por un organismo patógeno, así como métodos de medición de dichos síntomas, se conocen en la técnica.

- Como alternativa, donde un antígeno heterólogo es un antígeno asociado al cáncer o a un tumor, una "cantidad eficaz" de un polipéptido o complejo químérico, o una construcción de ácido nucleico a partir de la cual se expresa el polipéptido o complejo químérico, es una cantidad que es eficaz en una vía de administración para provocar una respuesta inmunitaria eficaz para reducir o inhibir el crecimiento de células cancerosas o tumorales, reducir la masa de células cancerosas o tumorales o el número de células cancerosas o tumorales, o reducir la probabilidad de que se forme un cáncer o un tumor. Una cantidad eficaz puede reducir el crecimiento tumoral y/o el número de células tumorales en un individuo en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % o más, en comparación con el crecimiento del tumor y/o el número de células tumorales en un individuo no tratado con el polipéptido o complejo químérico. Los métodos para medir el crecimiento tumoral y el número de células tumorales son conocidos en la técnica.
- La cantidad de polipéptido o complejo químérico en cada dosis se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunitaria al polipéptido de ectodomio codificado, y/o que induce una respuesta immunoprotectora u otra respuesta inmunoterapéutica sin efectos secundarios adversos significativos asociados normalmente a las vacunas. Dicha cantidad variará dependiendo del polipéptido de ectodomio específico que se emplee, si la formulación de la vacuna comprende o no un adyuvante, y una diversidad de factores dependientes del hospedador.
- Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un receptor por vías convencionales, que incluyen, pero sin limitación, parenteral (por ejemplo, intravenosa).
- Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un receptor de forma aislada o junto con agente(s) terapéutico(s) adicional(es). Cuando una composición farmacéutica se administra concomitantemente con agente(s) terapéutico(s), la administración puede ser simultánea o secuencial (es decir, administración de la composición farmacéutica seguida de la administración del(de los) agente(s) o viceversa).
- Normalmente, en aplicaciones de tratamiento, el tratamiento puede ser mientras dure el cuadro clínico o la afección. Además, será evidente para un experto en la materia que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosis individuales vendrán determinados por la naturaleza y el alcance del cuadro clínico o la afección que se esté tratando, la forma, la vía y el sitio de administración, y la naturaleza del individuo concreto que se esté tratando. Las condiciones óptimas pueden determinarse utilizando técnicas convencionales.
- En muchos casos (por ejemplo, aplicaciones preventivas), puede ser deseable tener varias o múltiples administraciones de una composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. Las administraciones pueden ser a intervalos de aproximadamente una a aproximadamente doce semanas, y pueden ser a intervalos de aproximadamente una a aproximadamente cuatro semanas. La readministración periódica puede ser deseable en el caso de exposición recurrente a un patógeno particular o a otro componente asociado a la enfermedad al que se dirige una composición farmacéutica de la presente invención.
- También será evidente para un experto en la materia que el curso óptimo de administración puede determinarse utilizando pruebas convencionales de determinación del curso del tratamiento.
- Cuando dos o más entidades se administran a un sujeto "conjuntamente" o "concomitantemente", pueden administrarse en una única composición al mismo tiempo, o en composiciones separadas al mismo tiempo, o en composiciones separadas y separadas en el tiempo.
- Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en múltiples dosis separadas. Por consiguiente, los métodos para la prevención (es decir, la vacunación) y el tratamiento de la infección descritos en el presente documento comprenden la administración de múltiples dosis separadas a un sujeto, por ejemplo, durante un periodo de tiempo definido. Por consiguiente, los métodos para la prevención (es decir, la vacunación) y el tratamiento de la infección divulgados en el presente documento incluyen la administración de una dosis de cebado de una composición farmacéutica de la presente invención. La dosis de sensibilización puede ir seguida de una dosis de refuerzo. El refuerzo puede tener por objeto la revacunación. La composición farmacéutica o la vacuna pueden administrarse al menos una vez, dos veces, tres veces o más.
- Los métodos de medición de la respuesta inmunitaria son conocidos por los expertos en la materia. Los métodos ilustrativos incluyen ensayos heterogéneos en fase sólida (es decir, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), ensayos en fase de solución (por ejemplo, ensayo de electroquimioluminiscencia), ensayos homogéneos de proximidad luminiscente amplificados, citometría de flujo, tinción intracelular de citocinas, ensayos funcionales de linfocitos T, ensayos funcionales de linfocitos B, ensayos funcionales de monocitos-macrófagos, ensayos con células dendríticas y células endoteliales reticulares, medición de las respuestas de las células NK, producción de IFN-γ por células inmunitarias, cuantificación de ARN/ADN viral en tejidos o fluidos biológicos (por ejemplo, cuantificación de ARN o ADN viral en suero u otro fluido o tejido/órgano), ensayos de explosión oxidativa, ensayos de lisis celular

citotóxica específica, ensayos de unión de pentámeros y evaluación de la fagocitosis y la apoptosis.

Las presentes realizaciones son, por lo tanto, para considerarse en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

5 Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, a continuación, se describirán realizaciones preferidas particulares mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

F del RSV

15 Como ilustración de la capacidad de la presente invención para producir polipéptidos quiméricos que comprenden un ectodominio de una proteína de fusión viral restringido en una conformación de prefusión, se proporcionan evidencias representativas de la proteína de fusión del virus respiratorio sincitial.

Materiales y métodos

DISEÑO DE POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO:

20 El ectodominio de F del RSV, así como un mutante del ectodominio de F del RSV (F ds cav del RSV) que comprende mutaciones en 4 sitios (S155C, S290C, S190F y V207L), según McLellan et al., (*Science* 2013. 342(6158):592-8), cada uno se conectaron operativamente a una fracción estabilizadora de la estructura (SSM) heteróloga aguas abajo que comprende un par de regiones de repetición en héptada complementarias derivadas de la GP160 del VIH-1. También se produjeron una construcción de ectodominio de control que carecía de esta SSM y una construcción de control positivo que comprendía la F ds cav del RSV operativamente conectado a la SSM de foldon (F ds cav foldon del RSV). A continuación, se presentan las secuencias de aminoácidos de las proteínas relevantes.

Ectodominio de F del RSV (1-520):

```
MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTIVITIELSNI  
KKNKCNNGTDAKVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKTKNTVTLSSKKRKRRL  
GFLLGVGSIAISGVAVSKVLUHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLSDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSI  
SNIETVIEFQQKNNRLLTEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS  
IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPCLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV  
FCDTMNSLTLPSEVNLCNVDFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY  
VSNKGVDTVSVGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN  
AGK [SEQ ID NO: 146].
```

Ectodominio de F del RSV (1-520) - SSM basada en GP160 del VIH:

```
MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTIVITIELSNI  
KKNKCNNGTDAKVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKTKNTVTLSSKKRKRRL  
GFLLGVGSIAISGVAVSKVLUHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLSDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSI  
SNIETVIEFQQKNNRLLTEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS  
IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPCLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV  
FCDTMNSLTLPSEVNLCNVDFNPKYDCEIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY  
VSNKGVDTVSVGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN  
AGKSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGJKQLQARILAGGSGGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQP  
AKDEQELLE [SEQ ID NO: 147].
```

Ectodominio de F del RSV (1-520) - mutaciones DScav - SSM basada en GP160 del VIH:

40 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTIVITIELSNI
KKNKCNNGTDAKVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKTKNTVTLSSKKRKRRL

GFLLGVGSAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNSNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLLTREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMC
 IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTLPESEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSGJVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMEDREINNYTSIHSILIESQNQP
 AKDEQELLE [SEQ ID NO: 150].

Ectodominio de F del RSV (1-513) - mutaciones DScav - SSM de foldon (control según McLellan et al., (Science 2013. 342(6158):592-8));

5

MELLILKANAITTILTAVTFCASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTTSVITIELSNI
 KKNKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNAKTKTNVTLSSKKRKRRL
 GFLLGVGSAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNSNGSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLLTREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMC
 IIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTLPESEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDTVSGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSA/G
 GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGLVPRGSGSAWSHPQFEK [SEQ ID NO: 151]

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

- 10 Secuencias de ADN con codones optimizados que codifican las proteínas de fusión quiméricas F pinza del RSV, F ds cav pinza del RSV, F ds cav foldon del RSV, y un ectodominio de F del RSV de control que carecía de las secuencias HRA y HRB del VIH-1 se incorporaron al vector de expresión eucariota pIRE2 aguas abajo del promotor del CMV. Los plásmidos resultantes se transfecionaron en células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en medio de CHO químicamente definido (CD-CHO) (Gibco) que contenía 600 µg de plásmido y 2,4 mg de polietilenimina lineal en 300 ml de células CHO a una densidad de 1×10^6 células por ml. Después de 4 h de incubación con el reactivo de transfección, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 300 ml de CD-CHO con 8 mM de Glutamax (Gibco), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), 7,5 % de alimento A eficiente de CHO-CD (Gibco), y 7,5 % de alimento B eficiente de CHO-CD (Gibco). A continuación, las células se incubaron durante 7 días a 37 °C, CO₂ al 5 %, agitando a aproximadamente 120 rpm. Después de 7 días se eliminaron las células mediante centrifugación durante 10 min a 6.000 x g y se filtró el sobrenadante.
- 15
- 20

Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales específicos acoplados covalentemente a columnas HiTrap HP activadas con NHS (GE). La F del RSV estabilizada con pinza química se purificó mediante mAb 1281 (Frey, et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2010. 17(12):1486-91) que se une al haz de 6 hélices formado por HRA y HRB del VIH-1. La F ds cav pinza del RSV, Las proteínas químéricas F ds cav foldon del RSV y F del RSV de control se purificaron utilizando mAb 101F (McLellan, et al. *J. Virol.* 2010. 84(23):12236-44). La purificación de la proteína deseada se confirmó mediante SDS-PAGE.

Resultados

30

CONFORMACIÓN DE LA PROTEÍNA:

La conformación de las proteínas se evaluó con anticuerpos monoclonales específicos de conformación. La incorporación de la SSM basada en las secuencias HR1 y HR2 de la GP160 del VIH-1 aguas abajo del ectodominio actúa como una especie de "pinza molecular" que impide que el polipéptido de ectodominio de fusión se reordene a una conformación postfusión. Las evidencias de que dicha proteína de fusión químérica se estabiliza en la conformación de prefusión mientras que el ectodominio desnudo correspondiente (es decir, expresado solo) conforma la conformación de posfusión se muestran en las Figuras 1A-C.

40

EJEMPLO 2

HA de la INFA

Como otra ilustración de la capacidad de la presente invención para producir polipéptidos químicos que comprenden un ectodominio de una proteína de fusión viral restringido en una conformación de prefusión, se proporcionan evidencias representativas de la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe A (INFA). De manera adicional, se proporcionan evidencias representativas para la proteína HA de la INFA de que la proteína químérica restringida en la

conformación de prefusión mediante el método anteriormente mencionado es capaz de inducir una respuesta inmunitaria neutralizante perfeccionada tras su administración a ratones.

Materiales y métodos

- 5 DISEÑO DE POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO:
 El ectodominio de HA de la INFA se conectó operativamente a una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga aguas abajo que comprende un par de regiones de repetición en héptada complementarias derivadas de la GP160 del VIH-1. A continuación, se presentan las secuencias de aminoácidos de la proteína quimérica resultante y su control.

Ectodominio de HA de la INFA (1-529):

```

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSS
STGEICDSPHQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKEYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
NNESFNWTGVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTNLNFKPALNVTPMNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIF
LYAQASGRITVSTKRSQQTAIPNIGSRPRVRNIPSRSIYWTIVKPGDILLSTGNLIAPRGYFKIRSGESSIMRS
DAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG
MVDGWYGFRHQNSEGGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKID
LWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRD
EALNNRFQIKGVVELKSGYKD [SEQ ID NO: 148].

```

- 15 Ectodominio de HA de la INFA (1-529) - SSM basada en GP160 del VIH:

```

MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSS
STGEICDSPHQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKEYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEF
NNESFNWTGVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTNLNFKPALNVTPMNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIF
LYAQASGRITVSTKRSQQTAIPNIGSRPRVRNIPSRSIYWTIVKPGDILLSTGNLIAPRGYFKIRSGESSIMRS
DAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG
MVDGWYGFRHQNSEGGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKID
LWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRD
EALNNRFQIKGVVELKSGYKDGSIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDRE
INNYTSIHSLSIEESQNQPAKDEQELLE [SEQ ID NO: 149].

```

20 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

Se incorporaron al vector de expresión eucariota pIRE2-3 secuencias de ADN con codones optimizados que codificaban la proteína de fusión quimérica H3 pinza de la gripe o un ectodominio de control que carecía de las secuencias HRA y HRB del VIH-1, después del promotor del CMV. Los plásmidos resultantes se transfecaron en células CHO y las células transfectadas se cultivaron y recogieron de acuerdo con el Ejemplo 1.

Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales específicos acoplados covalentemente a columnas HiTrap HP activadas con NHS (GE). La HA quimérica de la gripe estabilizada con pinza se purificó mediante mAb 1281 (Frey, et al., *Nat Struct Mol Biol*. 2010. 17(12):1486-91) que se une al haz de 6 hélices formado por HRA y HRB del VIH-1. El ectodominio de la HA de la gripe se purificó con mAb C05 (Ekert, et al., *Nature*, 2012. 489(7417): 526-32). La purificación de la proteína deseada se confirmó mediante SDS-PAGE. La vacuna comercial tetravalente contra la gripe (QIV) para la temporada 2015 se adquirió de Sanofi Pasteur, Fluquadri™.

35 **Resultados**

CONFORMACIÓN DE LA PROTEÍNA:

La conformación de la proteína se evaluó con anticuerpos monoclonales específicos de conformación y cromatografía de exclusión por tamaño. La incorporación de la SSM basada en las secuencias HR1 y HR2 de la GP160 del VIH-1 aguas abajo de los ectodominios respectivos actúa como una especie de "pinza molecular" que inhibe el reordenamiento del polipéptido de ectodominio de fusión hacia una conformación posfusión. En las Figuras 2 y 3 se muestran evidencias de que dicha proteína de fusión quimérica se estabiliza en la conformación de prefusión mientras que el ectodominio desnudo (es decir, expresado solo) conforma la forma de posfusión.

INMUNIZACIÓN ANIMAL:

- Para probar la utilidad de las proteínas de fusión virales estabilizadas en su forma de prefusión mediante la incorporación de la fracción formadora del haz de 6 hélices como inmunógenos, se inmunizaron ratones BALB/c con la HA de la gripe estabilizada con pinza químérica, el correspondiente ectodominio no estabilizado o la QIV comercial.
- 5 Se inmunizaron cinco ratones BALB/c por grupo con 5 µg de proteína purificada (o PBS) con 3 µg de adyuvante de saponina Quil-A. La inmunización se realizó mediante administración intradérmica y los ratones se inmunizaron dos veces, con tres semanas de diferencia. Tres semanas después de la segunda inmunización, los ratones se sacrificaron y se recogieron los sueros. Se evaluó el efecto de neutralización de sueros agrupados de cada grupo contra la gripe A/Hebei Baoding Anguo/51/2010 (H3N2) en una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT). Los sueros de ratones vacunados con HA de la gripe químérica estabilizada con pinza mostraron una fuerte actividad neutralizante con un valor CI₅₀ de 1:14.000 (IC 95 % 11.000-17.000), mientras que los sueros de ratones vacunados con el ectodominio de HA correspondiente no mostraron actividad neutralizante ni siquiera a la dosis más alta probada de 1:20 y los sueros de ratones vacunados con QIV comercial muestran neutralización con un valor CI₅₀ de aproximadamente 1:180. Por lo tanto, la estabilización de la forma de prefusión de la HA de la gripe mediante la incorporación de una fracción estabilizadora de la estructura comprendida por HR1 y HR2 del VIH-1 es crítica para una fuerte respuesta inmunitaria neutralizante y es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria neutralizante en aproximadamente 80 veces en comparación con una vacuna inactivada comercial actual.
- 10
- 15
- 20 Para confirmar que la HA estabilizada con pinza inducía una nueva población de anticuerpos que no interactuaban con la HAsol posfusión ni con la H3pinza de la QIV comercial, se preincubaron sueros de ratones vacunados con H3sol o QIV para eliminar cualquiera de los anticuerpos capaces de unirse a estas formas (Figura 4, barras blancas). Ni la incubación con H3sol ni con QIV dio como resultado una disminución de la neutralización del virus, sin embargo, la preincubación con H3pinza dio como resultado la eliminación completa de la actividad de neutralización del virus.
- 25
- 30
- 35

Para probar si la respuesta inmunitaria inducida era específica para el subdominio de la cabeza o del tallo de la HA, la reactividad ELISA se comparó con la H3pinza completa y con un dominio solo del tallo de H3 (como se ha descrito anteriormente en la Sección 2.3.2). Antes de la prueba ELISA, se preincubaron sueros de ratón con la GP pinza del EBOV (como se ha descrito anteriormente en la Sección 2.3.12) para reabsorber anticuerpos específicos para el propio dominio pinza. A continuación, se añadieron sueros a una placa ELISA recubierta con H3pinza o H3tallo y se midió la reactividad de los anticuerpos humorales mediante ELISA. Se compararon los factores de dilución que producían la mitad de la absorbancia máxima para estimar el porcentaje de inmunidad específica para el dominio del tallo. La inmunidad al dominio de la cabeza se estimó restando la inmunidad específica al dominio del tallo del total (véase la Figura 5). La inmunización con H3pinza produjo aproximadamente un 25 % de inmunidad humoral reactiva con el dominio del tallo y un 75 % con el dominio de la cabeza. En cambio, la inmunización con QIV solo dio como resultado un 4 % de inmunidad humoral reactiva con el dominio del tallo y un 96 % con la cabeza, y la inmunización con H3sol solo dio lugar a un 1 % de inmunidad humoral reactiva con el dominio del tallo y un 99 % con la cabeza.

Se comparó la reactividad de la respuesta inmunitaria con H5 de la gripe aviar H5N1 utilizando la construcción H5pinza (como se ha descrito anteriormente en la sección 2.3.3). También se incluyó en el análisis el suero de ratones vacunados con H5pinza o H1pinza. Antes de la prueba ELISA, los sueros de ratón se preincubaron con la GP pinza del EBOV (como se ha descrito anteriormente en la Sección 2.3.12) para reabsorber los anticuerpos específicos del propio dominio de la pinza. A continuación, se añadió suero a una placa ELISA recubierta con H5pinza y se midió la reactividad de los anticuerpos humorales mediante ELISA. Se calcularon los títulos de criterio de evaluación, que se presentan en la Figura 6. H3pinza y H1pinza mostraron una reactividad cruzada sustancial con H5, que fue significativamente mayor que la de QIV (27 veces mayor y 81 veces mayor, respectivamente).

A continuación, los presentes inventores se propusieron determinar el subdominio responsable de la reactividad cruzada de H5. Antes de medir la reactividad ELISA con H5 ELISA, se preincubó suero de ratón con la GP pinza del EBOV (como se ha descrito anteriormente en la Sección 2.3.12) y/o el dominio de solo tallo de H3 H3tallo (como se ha descrito anteriormente en la Sección 2.3.2) para preabsorber anticuerpos específicos del propio dominio de pinza y/o el dominio de H3 tallo o se añadió el anticuerpo monoclonal humano Fi6v3 (Corti et al., PNAS 2011) para superar a los anticuerpos específicos del tallo. A continuación, se añadió suero a una placa ELISA recubierta con H5pinza y se calcularon los títulos del criterio de evaluación mediante ELISA (Figura 7). Los ratones inmunizados con QIV mostraron una baja reactividad con H5 que solo se vio mínimamente afectada por la competencia absorción del tallo/Fi6V3. Los sueros de ratones inmunizados con la H5pinza mostraron una elevada reactividad que no se vio afectada por la competencia absorción del tallo/Fi6V3, lo que indica una fuerte respuesta inmunitaria específica de la cabeza. Sin embargo, los sueros de ratones inmunizados con H1 pinza o H3 pinza mostraron una fuerte reactividad con H5 y ésta se redujo significativamente por la competencia absorción del tallo/Fi6V3, lo que indica que una respuesta específica del tallo es responsable de la reactividad cruzada de H5.

60

EJEMPLO 3

PROTEÍNA DE LA ESPÍCULA DE MERS

65 Como una ilustración más de la capacidad de la presente invención para producir polipéptidos químéricos que comprenden un ectodominio de una proteína de fusión viral restringida en una conformación de prefusión, se

proporcionan evidencias representativas de la proteína de la espícula del virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS).

Materiales y métodos

- 5 DISEÑO DE POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO:
 El ectodominio de la proteína de la espícula de MERS se conectó operativamente a una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga aguas abajo que comprende un par de regiones de repetición en héptada complementarias derivadas de la GP160 del VIH-1. A continuación, se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica resultante.

Ectodominio de la proteína de la espícula de MERS (1-1296) - SSM basada en GP160 del VIH:

```

  MIHSVFLLMFLLTPTESYDVGPDSVKSACIEVDIQQTFDKTWPRP1DVS KADGIIYPQGR
  TYSNITITYQGLFPYQGQDHGDMYVYSA GHATGTTPKL FVAN YSQDV KQFANGF VVRIGAAANSTGTVIISPSTS
  ATIRKTI PAFMLGSSVGNFS DGKMG RGF NHTLVLLPD CGT LLRAF YCILE PRSGN HCPAG NSY TSFAT YHTPATD
  CSDGNYNRNASLNSFKEYNLRNCTM YTYNITEDEI ELEWFGITQTAQGVHUFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYD
  TIKYYSIIPH SIRSIQS DORKAWAAF YVYKLQPLTFLLOF SV DGYI RRAIDCGFN DLSQLHCS YESFDV ESGV YSVSS
  FEAKPSGSV VEQ AEGVECD FSPLLS GTTPQVYNFKRLVFTNCN YNLTKL LSLF SVNDFTCS QISPA AIA SNCYSSLI
  LDYFSYPLSMKSDLGVSSAGPISQF NYKQSF SNPTCL E LATVPHN ILLTITKPLK YSYINKCSRLLS DDT E VPQLVN
  ANQYSPCVSIVPSTVWE DGDY YRKQLS PLEGG GWL VASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGT DTNSVC PKLE FAN
  DTKIASQLGNCV EYSLYGVSGRGV FQNCTAV GVRQQR FVYDAY QNLV GYSSDDG NYCL RACV SVPV SIYDKE
  TKTHATLFGSVACEHIS STM SQY SRS TRSML KRRD STY GLP QT PVGCV LGV VNSSL FVED CKLPLG QSL CAL PDT
  PSTLTPRSVRSPVGEMR LASIA FNHP IQVQDFN SSYFKL SPTNF SFGVTQEYI QT TIQKVTV DCK QYI CNGF QKC
  EQLLREYQFC SKIN QALHGANLRQ DDS VRNL FAS VKSS QSSPII PG FGGDF NLLEPV SIST GSRS AR SAIE DL
  LFDKV TIA DPGYM QGY DDCM QQGP ASARD LICA QYVAGY KVLPPLMDVNMEAAYTSSLLG SIAGV GWTAGLSS
  FAAPFAQS IFYRL NGV GITQQVLSENQ KLIANKF NQ ALGAM QTGF TTTNEA FRKVQDA VNNNA QALSKLASELS
  NTFGAISASIGDII QR LDV LEQ DQA QTD RL IN GR LTU NA FVAQ QL VRSE SA ALSA QLAK DV NCEV KA QSK RSGF
  CGQGTHI VSFV V NAPNG LYFMHV GYPSN HIEV V SAY GLC DAAN PTNC IAPV NGYFI KT NTRIV D EWSY TGSSF
  YSPEPITS LNTKY VAPQV TYQ NIST NLPP PLLGN STG D FQ D E FPKN VST S IPNFG SLT QINT TLLD LT Y EMLSL
  QQVKALNES YIDL KEL GN YTY NNK WPGG SGIV QQ QN LLRA IAE AQQH LLQ LTVWG IKQL QARI LAGG SGGH TT
  WMEWDREIN NYT S LHS LIEE S QN Q QEK NEQ ELLE [SEQ ID NO: 152].
  
```

- 15 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:
 Se incorporó al vector de expresión eucariota pIRE2 una secuencia de ADN con codones optimizados que codifica la proteína de fusión quimérica S pinza de MERS, siguiendo el promotor del CMV. El plásmido resultante se transfeció en células CHO y las células transfectadas se cultivaron y recogieron de acuerdo con el Ejemplo 1. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad con mAb 1281 (Frey, et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2010. 17(12):1486-91) como se describe en el Ejemplo 1.

25 Resultados

CONFORMACIÓN DE LA PROTEÍNA:

- 30 La conformación de la proteína se evaluó utilizando SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados presentados en la Figura 8 indican que la proteína de fusión quimérica S pinza de MERS se estabiliza en una conformación de prefusión.

EJEMPLO 4

35 **GP del EBOV**

- Otra ilustración más de la capacidad de la presente invención para producir polipéptidos quiméricos que comprenden un ectodominio de una proteína de fusión viral restringido en una conformación de prefusión, se proporcionan evidencias representativas de la glucoproteína (GP) del EBOV. Se proporcionan más evidencias como ilustración de 40 la estabilidad de este polipéptido quimérico a altas temperaturas durante períodos prolongados. De manera adicional, se proporcionan evidencias representativas para la GP del EBOV de que la proteína quimérica restringida en la

conformación de prefusión mediante el método anteriormente mencionado es capaz de inducir una respuesta inmunitaria neutralizante tras su administración a ratones.

Materiales y métodos

- 5 DISEÑO DE POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO:
- Una GP del EBOV carente del dominio similar a la mucina se conectó operativamente a una fracción estabilizadora de la estructura heteróloga aguas abajo que comprende un par de regiones de repetición en héptada complementarias derivadas de la GP160 del VIH-1. A continuación, se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica resultante.

Ectodominio de GP del EBOV, menos dominio similar a la mucina (1-311,462-650)- SSM basada en GP160 del VIH

```

MGVTGILQLPDRDFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVSHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
LSVGQNLEGNGVATDVP5ATKRWGFRSGVPPKVNYEAGEWAENCYNLEIKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
YVHKVSGTGPCAGDFAPHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSG
YYSTTTRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQNETIYTSGKRSNTTGKLIVKVNPEIDTTIGEWA
FWETKKNLTRKIRSEELSFTVVGGNNTHHQDTGEESASSGKGLGITNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAPKCN
PNLHYWTTQDEGAATGLAWIPIYFGPAAEGLYIEGLMHNQDGGLICLRQLANETIQALQLFLRATTTELRTFSILNRK
AIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQGGSGIVQQQN
NLLRAIAAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMEDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE
[SEQ ID NO: 139].

```

- 15 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:
- 20 Se incorporó al vector de expresión eucariota pIRE2 una secuencia de ADN con codones optimizados que codificaba la GP delta mucina pinza del EBOV, aguas abajo del promotor del CMV. El plásmido resultante se transfeció en células CHO y las células transfectadas se cultivaron y recogieron de acuerdo con el Ejemplo 1. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando mAb Kz52 (Murin et al., PNAS. 2014 11(48):17182-7).

Resultados

- 25 CONFORMACIÓN DE LA PROTEÍNA:
- La conformación de las proteínas se evaluó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de condiciones reductoras, y con anticuerpos monocionales específicos de conformación. Los resultados presentados en las Figuras 9 a 11 indican que la proteína de fusión quimérica GP delta mucina pinza del EBOV se estabiliza en una conformación prefusión, y que esta conformación es estable incluso a temperaturas relativamente altas durante períodos prolongados (véase, Figura 11).

- 35 INMUNIZACIÓN ANIMAL:
- 30 Para seguir probando la utilidad de las proteínas de fusión virales estabilizadas en su forma de prefusión mediante la incorporación de la fracción formadora del haz de 6 hélices como inmunógenos, se inmunizaron ratones BALB/c con la construcción GP delta mucina del EBOV estabilizada con pinza quimérica. Se inmunizaron cinco ratones BALB/c por grupo con 1 µg de proteína purificada (o PBS) con o sin 3 µg de adyuvante de saponina Quil-A. La inmunización fue vía administración intradérmica y los ratones se inmunizaron tres veces, con tres semanas de diferencia. Tres semanas después de la tercera inmunización, los ratones se sacrificaron y se recogieron los sueros. Se evaluó la respuesta específica de la GP del EBOV después de cada inmunización (Figura 12). Se evaluó el efecto de neutralización de los sueros de cada ratón frente a ZEBOV vivo en condiciones PC4 en el "Australian Animal Health Laboratory" (AAHL) en una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) (Figura 13). Los sueros de los ratones vacunados con la construcción de delta mucina de GP del EBOV estabilizada con pinza quimérica mostraron una fuerte actividad neutralizante con un título medio geométrico que produjo una reducción del 50 % en las unidades formadoras de placa calculado para ser 52,8 (IC 95 %: 24,5-114,0).

EJEMPLO 5

- 50 INMUNOSILENCIAMIENTO DE PINZA
- Este ejemplo ilustra la capacidad de la presente invención para producir polipéptidos quiméricos, en la que las regiones expuestas a disolventes de la secuencia de la pinza se modifican para incorporar glucosilaciones ligadas a N. Se proporcionan evidencias representativas para la GP del EBOV y se demuestra que estas modificaciones facilitan el

blindaje del dominio de la pinza frente al reconocimiento por parte del sistema inmunitario adaptativo.

Materiales y métodos

5 DISEÑO DE POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO:

Una GP del EBOV carente del dominio similar a la mucina se conectó operativamente a cuatro SSM heterólogas diferentes aguas abajo, comprendiendo cada una un par de regiones HRA y HRB complementarias derivadas de la GP160 del VIH-1 en la que las regiones HRB individuales presentaban diferentes mutaciones que facilitaban la incorporación de glucosilaciones ligadas a N. A continuación, se presenta la secuencia de aminoácidos de estas proteínas químéricas.

Ectodominio de GP del EBOV, menos dominio similar a la mucina (1-311,462-650)- SSM basada en GP160 del VIH + G1:

15

```
MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
LSVGLNLEGNGVATDVSATKRWGRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSG
YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWA
FWETKKNLTRKIRSEELSFTVVGNNNTHQDTGEESASSGKLGTLNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAQPKCN
PNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPIYFGPAAEGIYIEGLMHNDQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTTELRTFSILNRK
AIDFLLQRWGGTCHILGPDCCTEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQGGSGIVQQQN
NLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGTTWMNWTREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQUELLE
[SEQ ID NO: 153]
```

Ectodominio de GP del EBOV, menos dominio similar a la mucina (1-311,462-650)- SSM basada en GP160 del VIH + G2:

20

```
MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
LSVGLNLEGNGVATDVSATKRWGRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSG
YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWA
FWETKKNLTRKIRSEELSFTVVGNNNTHQDTGEESASSGKLGTLNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAQPKCN
PNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPIYFGPAAEGIYIEGLMHNDQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTTELRTFSILNRK
AIDFLLQRWGGTCHILGPDCCTEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQGGSGIVQQQN
NLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGTTWMNWTREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQUELLE
[SEQ ID NO: 154]
```

Ectodominio de GP del EBOV, menos dominio similar a la mucina (1-311,462-650)- SSM basada en la GP160 del VIH + G3:

25

```
MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
LSVGLNLEGNGVATDVSATKRWGRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFFSSHPLREPVNATEDPSSG
YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWA
FWETKKNLTRKIRSEELSFTVVGNNNTHQDTGEESASSGKLGTLNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAQPKCN
PNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPIYFGPAAEGIYIEGLMHNDQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTTELRTFSILNRK
AIDFLLQRWGGTCHILGPDCCTEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQGGSGIVQQQN
NLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGTTWMNWTREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQUELLE
[SEQ ID NO: 155]
```

Ectodominio de GP del EBOV, menos dominio similar a la mucina (1-311,462-650)- SSM basada en GP160 del VIH + G4:

30

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVIIIFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQ
 LRSVGLNLEGNGVATDVSATKRWGRSGVPPKVNVYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCR
 YVHKVSGTGPCAGDFAFHKEAFFLYDRLA~~STVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKK~~DFFSSHPLREPVNATEDPSSG
 YYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEW
 FWETKKNLTRKIRSEELSFTVGGNNTHQDTGEESASSGKLG~~LITNTIAGVAGLITGGRR~~T~~RRAIVNAQPKCN~~
 PNLHYWTTQ~~DEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDG~~LICGLRQLANETTQALQLFLRATT~~E~~RTFSILNRK
 AIDFLLQRWGGTCHILGPDC~~CIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQGGSGIVQQQN~~
 NLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARI~~LAGGSGGTTWMEDREINNYTS~~LIHS~~LIEESQNQQEKNE~~NETLE
 [SEQ ID NO: 156]

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

- 5 Las secuencias de ADN con codones optimizados que codifican las construcciones anteriores se incorporaron al vector de expresión eucariota pIRE2-3 aguas abajo del promotor del CMV. Los plásmidos resultantes se transfecaron en células CHO y las células transfectadas se cultivaron y recogieron de acuerdo con el Ejemplo 1. Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando mAb Kz52 (Murin et al., *PNAS*. 2014 11(48):17182-7).

10

Resultados

- Para probar la posibilidad de disminuir el reconocimiento de la pinza por el sistema inmunitario adaptativo (inmunosilenciamiento) se introdujeron cuatro mutaciones separadas dentro de la HRB de la secuencia de la pinza basándose en la SSM basada en la GP160 del VIH que podrían facilitar la incorporación de glucosilaciones ligadas a N.

- Se purificaron GP quiméricas del EBOV (carentes del dominio similar a la mucina) que incorporaban la SSM modificada basada en la GP160 y se evaluó la reactividad con Kz52 para confirmar la conformación correcta de las proteínas purificadas. La reactividad de los sueros de ratones inmunizados con la HA de la gripe estabilizada con pinza química se probó frente a las proteínas químéricas del EBOV que incorporaban las secuencias de la pinza modificadas (Figura 14). La reactividad se redujo significativamente mediante la glucosilación en cada sitio individual, lo que apoya la hipótesis de que este método puede usarse para reducir la reactividad al dominio de pinza.

25 EJEMPLO 6

PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO ESTABILIZADO CON PINZA A PARTIR DE 8 VIRUS

- Este ejemplo demuestra la capacidad genérica de la presente invención para producir polipéptidos químéricos que comprenden un ectodominio de una proteína de fusión viral de una amplia gama de virus con envoltura y para que estos polipéptidos se purifiquen mediante un anticuerpo monoclonal específico del dominio de pinza.

Materiales y métodos

- 35 DISEÑO DE POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO:

- El ectodominio de HA de la INFA, F del RSV, F del Nipah y gB del HSV2 está conectado operativamente aguas abajo a la fracción estabilizadora de la estructura heteróloga que comprende un par de regiones de repetición en héptada complementarias derivadas de GP160 del VIH-1. A continuación, se presentan las secuencias de aminoácidos de la proteína químérica resultante y sus respectivos controles. Para la gripe se generó el ectodominio soluble carente de SSM, así como controles que incorporaban la SSM de foldon. Para F del RSV, se eliminó del diseño una región no esencial del ectodominio (aa106-144). Se generó ectodominio soluble carente de SSM, así como control positivo producido descrito por McLellan et al. (*Science*, 2013. 342(6158): 592-598) también se produjo el que incluía mutaciones en 4 sitios como (S155C, S290C, S190F y V207L y el foldon SSM. Para Nipah y HSV no se produjeron controles no estabilizados.

Ectodominio de HA de la gripe (A Switzerland 2013, H3N2) (1-533):

MGWSCIILFLVATATGVHSEQKLPGNNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATE
 LVQNSSIGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERS KAYSNCYPDVPDYASLRSLVASS
 GTLEFNNEFSN WAGVTQNGTSSCRRGSNSFFSRLNWLTHLNSKYPALNV TMPNNEQFDKLYIWGVHHPVTD
 KDQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGYRPRIRDIPS RISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSS
 IMRSDAPIGKCKSECITPNGSIPNDKFQVNVRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRN VPERQTRGIFGAIAGFIENG
 WEGMVDGWYGFRHQNSERGQAA DLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEYV
 TKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT DSEMNLFEKTKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHD
 VYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKD [SEQ ID NO: 157].

Ectodominio de HA de la gripe (A Switzerland 2013, H3N2) (1-533) - SSM de foldon:

5 MGWSCIILFLVATATGVHSEQKLPGNNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATE
 LVQNSSIGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERS KAYSNCYPDVPDYASLRSLVASS
 GTLEFNNEFSN WAGVTQNGTSSCRRGSNSFFSRLNWLTHLNSKYPALNV TMPNNEQFDKLYIWGVHHPVTD
 KDQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGYRPRIRDIPS RISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSS
 IMRSDAPIGKCKSECITPNGSIPNDKFQVNVRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRN VPERQTRGIFGAIAGFIENG
 WEGMVDGWYGFRHQNSERGQAA DLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEYV
 TKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT DSEMNLFEKTKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHD
 VYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDGGSAIGGYPEAPRGQAYVRKGDRWVLLSTFLGGLVPRGSGSAWHPQ
 PEK [SEQ ID NO: 158].

Ectodominio de HA de la gripe (A Switzerland 2013 H3N2) (1-533) - SSM basada en GP160 del VIH:

10 MGWSCIILFLVATATGVHSEQKLPGNNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATE
 LVQNSSIGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERS KAYSNCYPDVPDYASLRSLVASS
 GTLEFNNEFSN WAGVTQNGTSSCRRGSNSFFSRLNWLTHLNSKYPALNV TMPNNEQFDKLYIWGVHHPVTD
 KDQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGYRPRIRDIPS RISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSS
 IMRSDAPIGKCKSECITPNGSIPNDKFQVNVRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRN VPERQTRGIFGAIAGFIENG
 WEGMVDGWYGFRHQNSERGQAA DLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEYV
 TKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT DSEMNLFEKTKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHD
 VYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDGGSAIGGYPEAPRGQAYVRKGDRWVLLSTFLGGLVPRGSGSAWHPQ
 WDREINNYTSЛИHSLIEESQNQPAKDEQELLE [SEQ ID NO: 159].

Ectodominio de HA de la gripe (A California 2009, H1N1pdm) (1-526):

MKVKLVLCTFATANADTL CIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKL
 RGVALHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSFERFEIFPKT
 SSWPNHDSNKVGTAACPHAGAKSFYKNLWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVVLWGIHHPS TSADQQSLYQ
 NADTYVFVGSSRYSKKFPEIAIRPKVRDQEGRMYYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIIS
 DTPVHDCNTTCQTPKGAIANTSPLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRLFGAIAGFIEGGWTGM
 VDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLD
 IWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
 AKLNREEIDGVKLESTR [SEQ ID NO: 160].

Ectodominio de HA de la gripe (A California 2009, H1N1pdm) (1-526) - SSM de foldon:

MKVLLVLLCTFATANADTLICIGYHANNSTDVTLEKNVTVTHSVNLLEDKHNKGKLC
 RGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKT
 SSWPNHDNSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSTSADQQSLYQ
 NADTYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGIIIS
 DTPVHDCNTTCQTPKGAINSLPFQNIHPIITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRLFGAIAGFIEGGWTGM
 VDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLD
 IWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEE
 AKLNREEIDGVKLESTRGSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVPRGSGSAWSHPQFEK [SEQ
 ID NO: 161].

Ectodominio de HA de la gripe (A California 2009, H1N1pdm) (1-526) - SSM basada en GP160 del VIH:

5 MMVKVLLVLLCTFATANADTLICIGYHANNSTDVTLEKNVTVTHSVNLLEDKHNKGKLC
 KLRGVAPLHLGKCNIAWGWLGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKT
 KTSSWPNHDNSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSSTSADQQSL
 YQNADTYVFVGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVPRYAFAMERNAGSGII
 ISDTPVHDCNTTCQTPKGAINSLPFQNIHPIITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRLFGAIAGFIEGGWTG
 MVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFL
 DIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYS
 EEAKLNREEIDGVKLESTRGSGIVQQQNNLLRAIEAQHQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTWMEDREI
 NYTSLSIHSLEESQNQPAKDEQUELLE [SEQ ID NO: 162].

Ectodominio de F del RSV (1-516) - Etiqueta his:

10

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTsvitielsni
 KKNKCNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKKTNTVTLSKRKRRFL
 GFLLGVGSATASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI
 SNIETVIEFQKQNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
 IIKEEVILAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDTSVGNLTYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVG
 GGGHHHHHHH [SEQ ID NO: 163].

Ectodominio de F del RSV (1-513) - Mutaciones DScav -SSM de foldon:

15 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTsvitielsni
 KKNKCNGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKKTNTVTLSKRKRRFL
 GFLLGVGSATASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQSCSI
 SNIETVIEFQKQNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS
 IIKEEVILAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRV
 FCDTMNSLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDY
 VSNKGVDTSVGNLTYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIG
 GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVPRGSGSAWSHPQFEK [SEQ ID NO: 164]

Ectodominio de F del RSV (1-105,145-511) - SSM basada en GP1 60 del VIH

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEFYQSTCSAVSKGYSALRTGWYTSVITIELSNI
 KKNKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQILLMQSTQATNNNGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTN
 KAVVSLNSNGSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML
 TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVAYVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTNTKE
 GSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNSRVFCDTMNSLTPSEVNLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDV
 SSSVITSGLAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFY
 DPLVFPSPDEFDAISQVNEKINQSLAFIRKSDEGSQIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSG
 GHTTWMEWDREINNYTSIHSLIEESQNQQEKNEQUELLE (SEQ ID NO: 165).

Ectodominio de F del Nipah (1-483) - SSM basada en GP160 del VIH

MVVILDKRCYCNCNLILMISECSVGILHYEKLISKIGLVKGTRKYKIKSNPLTKDIVKMPNV
 VSNMSQCTGSVMENYKTRLNGILTPIKGALEYIKNNTHDLVGDRVLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMK
 NADNINKLKSSESTNEAVVQLQETAETKTVYVLTQDQYINTNLVPTIDK18CKQTELSLDLALSKYLSQDLPVPGP
 NLQDPVSNMSMTQAIQSQAFGGNYETLRLTGAYATEOFDDLESITGQIYVOLSSYYIVRVYFPILTEIQQAYIQ
 ELLPVSFNNONNSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFCITKRSVICNQDYATPMTNMRECLTGSTEKPRLVVSS
 HVPRFALSNGVLFANCISVCQCQTIGRAISQSGEQTLLMIDNTCTPAVLGNVIISLGKYLGSVNVNSEGIAIGP
 PVFTOKVDISSQISSMMNQSLQQSKDYIKEAQRLLTGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILA
 GGSGGGHTTWWMEWDREINNYTSIHSLIEESQNQQEKNEQUELLE (SEQ ID NO: 166).

5

Ectodominio de HSV1 gB (28-741) - Péptido señal IgK - SSM basada en GP1 60 del VIH:

MGWSCIILFLVATATGVHSERASGDVAATVAANGGPASQPPPVPSPATTKARKRKTKKPP
 KRPEATPPPDAVATVAAGHATLRAHLREIKVENADAQFYVCPPPTGATWVQFEQPRRCPTPEGQNYTEGIAAVV
 KENIAPYKPKATMYYKDVTVSQVWFHRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVRSTAKYVRNNMETTAFH
 RDDHETDMELEKPAKVATRTSRGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEVODARSVYPYDEFVLTGDFVYMS
 PFYGYREGSHTEHNTSYAADRFKQVDGFYARCLTTKARATSPTTRNLLTPKFTVAWDWVPKRAVCTMTKWQEVE
 DEMLRAEYGGSFRFSSDAISTTFTTNTLQYSLSRVDLGDCIGRDAREADRMFARKYNATHIKVGQPOQYLATGG
 FLIAYQPLLSNTLAELYVREYMREQDRKPRNATPAPLREAPSANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDML
 GRIAVAWCELQNHELTWNNEARLNPNAIASATVGRRVSARMLGDMVMAVSTCPVAPDNVIVQNSMRVSSRPG
 TCYSRPLVFSFRYEDQGPLIEGQLGENNELRLTRDALEPCTVGHRRYFIFGGGYVYFEYAYSHQLSRADVTTVSTF
 IDLNITMLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSLLDYTEVQRRRNQLHDLRFADIDTVIRADANAAMFAGLCAFFEGMGL
 GRGGGGSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWWMEWDREINNYTSIHSLIEES
 QNQQEKNEQUELLE (SEQ ID NO: 167).

10

Ectodominio de F del sarampión (1-488) - SSM basada en GP160 del VIH:

MGLKVNVSIAFMAVLLTLQPTPTGQIHWNGL5KIGVVGIG5ASYKVMTRSSHQSLVIKLMP
 NTLLNNCTRVEIAEYRLLRTVLEPIRDALNAMTQNIRPVQSVASSRRHKRFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIA
 LHQSMLNSQAIIDLNRASLETTNQAIETRQAGQEMILAVQGVQDYINNEIPLSMNQLSCDLIGQKLGKLLRYYT
 EILSUFGPSLRDPISAEISIQLSYALGGDINKVLEKLG5GGDLGJLESRGIKARITHVOTESYFIVLISIAYPTLSE
 IKGVIVHRLEGVSYNIGSQEWYTTVPKYVATQGYLISNFDESSCTPMPEGTVCSQNALYPMSPLLQECLRGSTKS
 CARTLVSGSGNRFILSQGNLIANCASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVEVNGVTIQVGSRRYPOAV
 YLHRIDLGPPISLERLQVGTNLGNIAKLEDAKELLESSDQILRSMKGGRSQIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTV
 WGIKQLQARILAGGSGGGHTTWWMEWDREINNYTSIHSLIEESQNQQEKNEQUELLE (SEQ ID NO: 168).

15

Ectodominio de GPC del virus de Lassa (1-423) - SSM basada en GP160 del VIH:

MGQIVTFFQEVPVIEVMNIVLIALSVLAVLKGLYNFATCGLVGLVTFLLCGRSCTTSLYK
 GVYELQTELNMETLNMTMPLSCTKNNSHHYIMVGNETGLELTNTSIINHKFCNLSDAHKKNLYDHALMSIIST
 FHLSIPNFNQYEAMSCDFNGGKISVQYNLHSYAGDAANHCGTVANGVLQTFMRMAWGGSYIALDSGRGNWD
 CIMTSYQYLIIQNTTWEDHCQFSRSPPIGYLGIL5QRTRDIYISRRLGTFTWTLSDSEGKDTPGGYCLTRWMLIE
 AELKCFGNTAVAKCNEKHDEEPCDMLRLFDFNKQAIQRLKAEAQMSIQLINKAVNALINDQLIMKNHLRDIMGIP
 YCNYSKYWYLNHTTGRTSLPKCWLVSNGSYLNETHFSDDIEQQADNMITEMLQKEYMERQG5GIVQQQNLL
 RAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEDREINNYTSIHSLIEESQNQQEKNEQELLE [SEQ
 ID NO: 169].

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

- 5 Secuencias de ADN con codones optimizados que codifican las proteínas de fusión químéricas, H1 foldon de la gripe, H1 pinza de la gripe, H3 foldon de la gripe, H3 pinza de la gripe, F pinza del RSV, F ds cav Foldon del RSV, S pinza de MERS y GP delta mucina pinza del Ébola, F pinza del virus Nipah, F pinza del virus del sarampión, GPC pinza del virus de Lassa, gB pinza del virus del herpes simple 2 (así como los correspondientes ectodominios de F del RSV y H3 de la gripe que carecen de las secuencias HRA y HRB del VIH-1) se incorporaron al vector de expresión eucariota pIRES-2 o pNBf siguiendo el promotor del CMV. Los plásmidos resultantes se transfecaron en células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en medios CHO químicamente definidos (CD-CHO) (Gibco) o en medios de expresión ExpiCHO (Gibco). Las células CHO se transfecaron combinando 600 µg de plásmido y 2,4 mg de polietilenimina lineal en 300 ml de células CHO a una densidad de 1×10^6 células por ml o 16 µg de plásmido con 640 µl de medio OPTI-pro sin suero (SFM), y 51,2 µl de expifectamina (Gibco). Después de 4 h de incubación, se sedimentaron las células CHO transfecadas con polietilenimina lineal, se retiró el medio que contenía el reactivo de transfección y se resuspendieron las células en 300 ml de CD-CHO que contenía 8 mM de Glutamax (Gibco), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), 7,5 % de alimento A eficiente de CHO-CD (Gibco), y 7,5 % de alimento B eficiente de CHO-CD (Gibco). Para células transfecadas con Expifectamina, después de 24 h de incubación se añadieron 96 µl de potenciador ExpiCHO y 3,84 ml de alimentación ExpiCHO. A continuación, se incubaron ambos conjuntos de células durante 7 días a 37 °C, CO₂ al 7,5 %, agitando a aproximadamente 120 rpm. Después de 7 días se eliminaron las células mediante centrifugación durante 10 min a 6.000 x g y se filtró el sobrenadante.
- 10 Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales específicos acoplados covalentemente a columnas HiTrap HP activadas con NHS (GE). La HA de la gripe estabilizada con pinza químérica, F del RSV, S de MERS, GP del Ébola, GPC del Lassa, F de Nipah, F del sarampión y gB del HSV2 se purificaron mediante mAb 1281 (Frey, et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2010. 17(12):1486-91) que se une al haz de 6 hélices formado por HRA y HRB del VIH-1. La H1 de la gripe estabilizada con pinza químérica y estabilizada con foldon y el ectodominio correspondiente para H1 se purificaron con mAb 5J8 (Hong, et al., *J. Virol.* 2013. 87(22): págs. 12471-80). La H3 de la gripe estabilizada con pinza químérica y estabilizada con foldon y el ectodominio correspondiente para H3 se purificaron con mAb C05 (Ekert, et al., *Nature*, 2012. 489(7417): 526-32). La F del RSV estabilizada con pinza químérica y estabilizada con foldon que incorpora las mutaciones ds cav, así como el ectodominio correspondiente de la F del RSV, se purificaron con mAb 101F (McLellan, et al. *J. Virol.* 2010. 84(23):12236-44). La purificación de la proteína deseada se confirmó mediante SDS-PAGE.
- 15 35 **Resultados**

PINZA MOLECULAR COMO MÉTODO GENÉRICO PARA LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

- 40 La expresión y purificación de las proteínas de fusión virales estabilizadas con pinza químérica de ocho virus se confirmó mediante SDS-PAGE (Figura 15). La incorporación de la SSM basada en las secuencias HR1 y HR2 de la GP160 del VIH-1 aguas abajo de los ectodominios permite la recuperación de diversas proteínas químéricas utilizando el mAb 1281 (Frey, et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2010. 17(12):1486-91) que se une al haz de 6 hélices formado por HRA y HRB del VIH-1.

45 ESTUDIO DE PROTECCIÓN EN RATONES TRAS LA EXPOSICIÓN AL VIRUS DE LA GRIPE H1N1PDM:

- Para ampliar los resultados que demuestran que la inclusión de la fracción formadora del haz de 6 hélices en el ectodominio de HA de la gripe puede provocar una respuesta inmunitaria ampliamente reactiva cruzada, realizamos 50 un experimento de exposición a la gripe dentro de ratones C57b. Este estudio también propuso comparar directamente la pinza molecular la fracción formadora del haz de 6 hélices con la SSM de foldon con respecto a la inducción de una protección cruzada de amplio espectro frente a subtipos de gripe divergentes. Los ratones C57b fueron vacunados con PBS, H1sol, H3sol, H1foldon, H3foldon, H1pinza o H3pinza. Las vacunas se emparejaron por dosis, cada una de las cuales contenía 5 µg de HA y 3 µg de QuilA, con ratones que recibieron tres dosis de vacuna administradas con dos semanas de separación. A continuación, los ratones se expusieron a la gripe Cal/09 (H1N1pdm) seis semanas después de la dosis inicial (n=5 ratones por grupo). Este estudio se diseñó para evaluar tanto la protección frente a

una cepa idéntica como la protección frente a un subtipo muy divergente. Los ratones se expusieron por vía intranasal al virus de la gripe A H1N1pdm a una "dosis baja" de 1×10^2 unidades formadoras de placas (UFP) y a una "dosis alta" de $5,5 \times 10^3$ UFP. Se midió diariamente la pérdida de peso durante un periodo de 14 días y los ratones se sacrificaron si perdían >20% de su peso corporal original.

Este estudio confirmó que la H1pinza es capaz de proporcionar una protección completa contra una cepa de gripe emparejada, al igual que H1sol y H1foldon (Figuras 16A y B). De interés particular, la inmunización con H3pinza también mostró una protección parcial contra la gripe H1N1pdm. En el caso de H3pinza, 3/5 ratones sobrevivieron al ser expuestos a la dosis baja de la gripe H1N1pdm y 2/5 ratones sobrevivieron al ser expuestos a la dosis alta de la gripe H1N1pdm (Figuras 16C y D). En comparación, ninguno de los ratones inmunizados con H3sol ni con H3 foldon sobrevivieron a la exposición a la dosis baja o alta de la gripe H1N1pdm, y solo 1/5 ratones sometidos a inmunización control con PBS sobrevivieron al desafío con la dosis baja de la gripe H1N1pdm. Una comparación entre los ratones que sobrevivieron a H1N1pdm tras la vacunación con H3pinza (SiO) en comparación con los ratones que sobrevivieron tras la vacunación control o la vacunación con H3sol o H3 foldon (1/30), demuestra la significancia estadística de que la protección frente a la gripe de amplio espectro esté mediada por H3pinza ($p=0,0003$; calculadora de chi cuadrado). Ya que los subtipos H3 y H1 pertenecen a grupos separados dentro del árbol filogenético de la gripe, este resultado indica un amplio nivel de protección y cabe esperar razonablemente que sean de amplio espectro todas las cepas y subtipos de gripe que sean igual o menos divergentes.

20 AUMENTO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA TRAS LA INCLUSIÓN DE LA SSM DE PINZA:

Para comparar directamente la estabilidad ofrecida por la SSM de pinza y la SSM de foldon, se incubaron antígenos purificados H1 foldon de la gripe, H1 pinza de la gripe, F ds cav foldon del RSV, y F pinza del RSV a 43°C durante 72 h y la reactividad con mAbs se usó como medida de estabilidad térmica. Para la comparación con F del RSV se usaron tres mAbs específicos de prefusión, D25 (McLellan et al., *Science* 2013. 340(6136): págs. 1113-7), MPE8 (Corti et al., *Nature*, 2013. 501(7467): págs. 439-43) y AM22 (McLellan et al., *Science* 2013. 340(6136): págs. 1113-7). Para la comparación de la HA de la gripe se utilizaron dos mAbs específicos del tallo, CR6261 (Ekiert et al., *Science* 2009. 324(5924): p. 246-51) y Fi6V3 (Corti et al., *Science* 2011. 333(6044): p. 850-6), y se utilizó un mAb específico para la cabeza, 5J8 (Hong, et al., *J. Virol.* 2013. 87(22): págs. 12471-80). La comparación directa reveló que la F pinza del RSV conservaba una reactividad significativamente mayor con mAbs específicos de prefusión que la F ds cav foldon del RSV tras la incubación a temperatura elevada (Figura 17A). De manera similar, la comparación directa reveló que la H1pinza de la gripe conservaba una reactividad significativamente mayor con mAbs específicos al tallo de HA que la H1 foldon de la gripe (Figura 17B). La retención de la reactividad con el mAb específico de la cabeza fue comparable entre la H1 pinza de la gripe y la H1foldon de la gripe. En conjunto, estos resultados demuestran la estabilidad superior de la SSM de pinza en comparación con la SSM de foldon.

RESPUESTA INMUNITARIA NEUTRALIZANTE INDUCIDA POR LA F PINZA DEL RSV:

Para probar la utilidad de las proteínas de fusión virales estabilizadas en su forma de prefusión mediante la incorporación de la fracción formadora del haz de 6 hélices como inmunógenos, se inmunizaron ratones BALB/c con la F pinza del RSV, F ds cav foldon del RSV, el ectodomino correspondiente del RSV (F sol del RSV) o sometidos a inmunización control con PBS. Se inmunizaron cinco ratones BALB/c por grupo con 5 μg de proteína purificada (o PBS) con 3 μg de adyuvante de saponina Quil-A. La inmunización se realizó por administración intradérmica y los ratones se inmunizaron tres veces cada tres semanas. Tres semanas después de la tercera inmunización, los ratones se sacrificaron y se recogieron los sueros. Se evaluó el efecto de neutralización de los sueros de ratones individuales frente a la cepa A2 del RSV en una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) (Figura 18). Los sueros de ratones vacunados con la F pinza del RSV estabilizada con pinza químérica mostraron una fuerte actividad neutralizante con un valor medio geométrico de CI50 de 8.124 (IC 95 % = 1.968-33.543), mientras que los sueros de ratones vacunados con la F ds cav foldon del RSV mostraron una actividad neutralizante con un valor medio geométrico de CI50 de 2.859 (IC 95 % = 794-10.290) y los sueros de ratones vacunados con la F sol del RSV mostraron una actividad neutralizante con un valor medio geométrico de CI50 de 562 (IC 95 % = 242-1.410). Por lo tanto, la estabilización de la forma de prefusión de la F del RSV mediante la incorporación de una fracción estabilizadora de la estructura comprendida por HR1 y HR2 del VIH-1 es fundamental para una fuerte respuesta inmunitaria neutralizante, que es aproximadamente 3 veces superior a la inducida por el enfoque de estabilización alternativo "ds cav foldon" (McLellan et al., *Science* 2013. 342(6158): págs. 592-8).

ESTABILIZACIÓN DE LA CONFORMACIÓN DE PREFUSIÓN DE LA F DEL VIRUS NIPAH:

Para validar aún más la utilidad de la SSM de pinza para estabilizar la conformación de prefusión de las proteínas de fusión virales, se incorporó la SSM de pinza al ectodomino de la F del virus Nipah y se expresó en células CHO. La proteína purificada por cromatografía de inmunofijación se analizó, a continuación, por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna superdex 200. La mayor parte de la F pinza del virus Nipah se eluyó a aproximadamente 11,5 ml, lo que equivale aproximadamente al tamaño esperado de la proteína trimérica, aproximadamente 180 kDa (Figura 19). Como se ha demostrado en el caso de la F del Paramyxovirus (Connolly et al., *PNAS*, 2006. 103(47): P. 17903-8), se esperaría que la transición de la F del virus Nipah a la conformación posfusión diera como resultado la exposición del péptido de fusión hidrófobo, impulsando de este modo la agregación

de la proteína. La presencia de la proteína trimérica soluble es, por lo tanto, una evidencia que apoya la presencia de la conformación de prefusión. La F pinza del virus Nipah purificada también se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa (Figura 19, recuadro). Dentro de la imagen TEM presentada, es claramente visible que las partículas de la F pinza del virus Nipah tienen un tamaño homogéneo y una topología coherente con la conformación de prefusión esperada. Los datos presentados apoyan aún más la capacidad de la SSM de pinza para estabilizar la conformación de prefusión de las proteínas de fusión virales.

RESPUESTA INMUNITARIA NEUTRALIZANTE INDUCIDA POR LA F PINZA DEL VIRUS NIPAH:

10 Para seguir probando la utilidad de las proteínas de fusión virales estabilizadas en su forma de prefusión mediante la incorporación de la fracción formadora del haz de 6 hélices como inmunógenos, se inmunizaron ratones BALB/c con la F pinza del virus Nipah o se sometieron a inmunización control con PBS. Se inmunizaron cuatro ratones BALB/c por grupo con 5 µg de proteína purificada (o PBS) con 3 µg de adyuvante de saponina Quil-A. La inmunización se realizó por administración intradérmica y los ratones se inmunizaron dos veces, con tres semanas de diferencia. Tres semanas después de la segunda inmunización, los ratones se sacrificaron y se recogieron los sueros. Se evaluó el efecto de neutralización de los sueros de ratones individuales frente al virus Nipah vivo (cepa Malaysian) en una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) bajo confinamiento de BSL4 (Figura 20). Todos los sueros de ratones vacunados con la F pinza del virus Nipah estabilizada con pinza químérica mostraron una fuerte actividad neutralizante con un valor medio geométrico de CI₅₀ de 48 (IC 95 % = 6-384), mientras que los sueros de ratones sometidos a inmunización control con PBS no mostraron actividad neutralizante a la concentración más alta de suero probada. Por lo tanto, este resultado proporciona más evidencias de que las proteínas de fusión virales químéricas que incorporan la SSM de pinza son capaces de provocar una respuesta inmunitaria neutralizante tras la vacunación.

INCORPORACIÓN DE LA SSM DE PINZA EN UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN VIRAL DE CLASE III:

25 Para validar aún más la utilidad de la SSM de pinza para la estabilización de proteínas de fusión virales, la SSM de pinza se incorporó al ectodominio de gB del HSV2 y se expresó en células CHO. La proteína purificada por cromatografía de inmunoafinidad se analizó, a continuación, por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superose 6. La mayor parte de la gB pinza del HSV2 eluyó a aproximadamente 15 ml, lo que equivale 30 aproximadamente al tamaño esperado de la proteína trimérica, aproximadamente 300 kDa (Figura 21). La gB pinza del HSV2 purificada también se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa (Figura 21, recuadro). Dentro de la imagen TEM presentada, es claramente visible que las partículas de la gB pinza del HSV2 tienen un tamaño homogéneo y una topología coherente con la estructura resuelta previamente mediante cristalografía de rayos X (Heldwein et al., *Science* 2006. 313(5784): 217-20). La hipótesis es que esta conformación 35 es la conformación de la gB del HSV2 posfusión. En concreto, la gB pinza del HSV2 también es capaz de unirse a la mayoría de los anticuerpos neutralizantes para HSV2 y puede ser útil como candidata a vacuna de subunidad (Cairns et al., *J. Vi.* 2014. 88(5): págs. 2677-89). Los datos presentados apoyan la capacidad de la SSM de pinza para estabilizar y purificar proteínas de fusión virales de Clase III, además de las proteínas de fusión virales de Clase I.

40 Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los polipeptídicos químéricos que comprenden un ectodominio de una proteína de fusión viral restringido en una conformación de prefusión pueden:

- inducir una respuesta inmunitaria de protección cruzada más amplia;
- son estables a temperaturas elevadas;
- inducir una respuesta inmunitaria neutralizante superior; y
- formarse usando ectodominios de Clase I o Clase III.

50 La citación de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "la "técnica anterior" en la presente solicitud.

A lo largo de la memoria descriptiva se ha tratado de describir las realizaciones preferidas de la invención sin limitar la invención a una realización cualquiera o colección específica de características.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de ectodomínio de fusión de virus con envoltura operativamente conectado aguas abajo a una fracción heteróloga, estabilizadora de la estructura que comprende 5 regiones complementarias de la primera repetición en héptada (HR1) y de la segunda repetición en héptada (HR2) que se asocian entre sí en condiciones adecuadas para que su asociación forme un haz de dos hélices antiparalelas, en donde las regiones HR1 y HR2 carecen de complementariedad con el polipéptido de ectodomínio, de modo que formen preferentemente entre sí un haz de dos hélices antiparalelas, en lugar de con elementos estructurales del polipéptido de ectodomínio, en donde el polipéptido de ectodomínio comprende al menos un epítopo de prefusión que 10 no está presente en la forma de posfusión de una proteína de fusión de virus con envoltura a la que corresponde el polipéptido de ectodomínio.
2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, en donde cada una de las regiones HR1 y HR2 se **caracteriza** 15 independientemente **por** un patrón de tipos de aminoácidos de 7 residuos repetido n veces, representado como (a-b-c-d-e-f-g)_n o (d-e-f-g-a-b-c)_n, en donde los elementos del patrón "a" a "g" indican posiciones convencionales de la héptada en las que se localizan los tipos de aminoácidos y n es un número igual o mayor de 2, y al menos el 50 % (o al menos del 51 % a al menos el 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales de la héptada "a" y "d" están ocupadas por tipos de aminoácidos hidrófobos y al menos el 50 % (o al menos del 51 % a al menos el 99 % y todos los porcentajes enteros entre los mismos) de las posiciones convencionales 20 de la héptada "b", "c", "e", 'f y 'g' están ocupados por tipos de aminoácidos hidrófilos, la distribución resultante entre los tipos de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos permite identificar las regiones de repetición en héptada.
3. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde una o ambas regiones HR1 y HR2 25 comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos de la región de repetición en héptada de la proteína de fusión del virus con envoltura de Clase I endógena.
4. El polipéptido quimérico de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las regiones HR1 y HR2 comprenden o consisten 30 en regiones endógenas complementarias de repetición en héptada A (HRA) y repetición en héptada B (HRB), respectivamente, de una o más proteínas de fusión de virus con envoltura de Clase I, incluyendo en donde la secuencia de aminoácidos de la región HRA y la secuencia de aminoácidos de la región HRB se derivan de la misma o diferente proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I, preferentemente en donde las regiones HR1 y HR2 se seleccionan independientemente de las regiones HRA y HRB de proteínas de fusión expresadas por ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, coronavirus, filovirus y arenavirus.
5. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la fracción estabilizadora de la 35 estructura (por ejemplo, incluida una o ambas regiones HR1 y HR2) comprende una fracción silenciadora inmunitaria que inhibe la provocación de una respuesta inmunitaria a la fracción estabilizadora de la estructura, preferentemente en donde la fracción inmunosilenciadora es un sitio de glucosilación que es reconocido y glucosilado por una enzima de glucosilación (por ejemplo, una glucosiltransferasa); y/o comprende uno o más aminoácidos no naturales, preferentemente en donde el uno o más aminoácidos no naturales permiten el acoplamiento de polietilenglicol, una 40 fracción inmunoestimulante, o un lípido (por ejemplo, para facilitar la formación de vesículas lípidicas, o partículas similares a virus, que muestran el ectodomínio del polipéptido quimérico, entre otros, para estimular una respuesta inmunitaria del hospedador).
6. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido de ectodomínio 45 corresponde a un ectodomínio de proteína de fusión de virus con envoltura de Clase I, preferentemente en donde el polipéptido de ectodomínio comprende una o ambas de una región HRA endógena y una región HRB endógena, preferentemente en donde la proteína de fusión de clase I es una de un virus con proteína de fusión de envoltura de Clase I seleccionado entre los ortomixovirus, paramixovirus, retrovirus, coronavirus, filovirus y arenavirus, o en donde 50 el polipéptido de ectodomínio corresponde a un ectodomínio de proteína de fusión de virus con envoltura de Clase III, preferentemente en donde la proteína de fusión de clase III es una de un virus con proteína de fusión de envoltura de clase III seleccionado entre los rabdovirus y los herpesvirus, preferentemente en donde el polipéptido de ectodomínio (por ejemplo, Clase I o Clase III) comprende o consiste en un polipéptido de ectodomínio precursor completo o una porción del mismo, preferentemente en donde la porción o polipéptido de ectodomínio carece de uno o más de un 55 péptido señal endógeno, un sitio de escisión de proteasa, una porción de cabeza endógena de un ectodomínio, una porción de tallo endógena de un ectodomínio, un dominio endógeno similar a la mucina, una región externa proximal de la membrana endógena y un péptido de fusión endógeno, preferentemente en donde uno o más sitios de escisión proteolítica endógena (por ejemplo, uno o más sitios de escisión por furina) de una proteína de fusión de tipo silvestre o de referencia se alteran o suprimen para hacer que el polipéptido de ectodomínio sea menos susceptible a la escisión proteolítica por una proteasa.
7. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las regiones HR1 y HR2 de la 60 fracción estabilizadora de la estructura están conectadas por un enlazador, preferentemente en donde el enlazador consiste en aproximadamente 1 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), o consiste en aproximadamente 1 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), o consiste en

- aproximadamente 50 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos (y todos los números enteros de residuos de aminoácidos entre los mismos), preferentemente en donde el enlazador comprende al menos una fracción seleccionada de una fracción de purificación que facilita la purificación del polipéptido químérico, una fracción inmunomoduladora que modula la respuesta inmunitaria al polipéptido químérico, una fracción específica de la célula y una fracción que confiere flexibilidad estructural.
- 5 8. El polipéptido químérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las regiones HR1 y HR2 se asocian entre sí para formar un haz de dos hélices antiparalelas en solución acuosa.
- 10 9. Una construcción de ácido nucleico para la producción endógena de un polipéptido químérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un organismo hospedador, en donde el organismo hospedador es preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.
- 15 10. Un polinucleótido que codifica un polipéptido químérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 9 o el polinucleótido de la reivindicación 10, en donde dicha construcción de ácido nucleico o dicho polinucleótido comprende ARNm.
- 20 12. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 9 u 11 para su uso en un método para provocar una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de virus con envoltura, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de la construcción de ácido nucleico.
- 25 13. Una composición que comprende una o más construcciones de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 9 u 11, en donde la composición es preferentemente una composición inmunomoduladora.
14. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para un polipéptido químérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, operativamente unido a un elemento regulador operable en la célula hospedadora.
- 30 15. Una célula hospedadora que contiene la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 14, preferentemente en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora procariota o una célula hospedadora eucariota.
16. Un método para producir un complejo polipeptídico químérico, en donde el método comprende:
- 35 combinar polipéptidos químéricos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones adecuadas para la formación de un complejo polipeptídico químérico, de modo que se produzca un complejo polipeptídico químérico que comprenda tres subunidades polipeptídicas químéricas y se **caracterice por** un haz de seis hélices formado por oligomerización de los haces de dos hélices de las respectivas fracciones estabilizadoras de la estructura de los polipéptidos químéricos.
- 40 17. El método de la reivindicación 16, en donde los polipéptidos químéricos se combinan en solución acuosa.
18. Un complejo polipeptídico químérico que comprende tres subunidades polipeptídicas químéricas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y se **caracteriza por** un haz de seis hélices formado por oligomerización de los haces de dos hélices de las respectivas fracciones estabilizadoras de estructura de los polipéptidos químéricos.
- 45 19. El complejo polipeptídico químérico de la reivindicación 18, en donde las subunidades polipeptídicas químéricas comprenden cada una un polipéptido de ectodominio de fusión de virus con envoltura, y en donde el complejo comprende al menos un epítopo de prefusión de una proteína de fusión de virus con envoltura de interés (por ejemplo, una proteína de fusión de virus con envoltura de tipo silvestre), o complejo de la misma, que no está presente en una forma posfusión de la proteína de fusión de virus con envoltura, o complejo de la misma.
- 50 20. Una composición que comprende un polipéptido químérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un complejo polipéptido químérico de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19, y un soporte, un diluyente o un adyuvante farmacéuticamente aceptables.
21. Un método para identificar un agente que se une con una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: poner en contacto el agente candidato con un polipéptido químérico que contenga ectodominio, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o con un complejo polipeptídico químérico de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en donde el polipéptido de ectodominio corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura, y detectar la unión del agente candidato al polipéptido químérico o al complejo polipeptídico químérico.
- 55 22. El método de la reivindicación 21, en donde el método comprende además poner en contacto el agente candidato con la proteína de fusión o el complejo de la proteína de fusión y detectar la unión del agente candidato a la proteína de fusión o al complejo, preferentemente en donde el agente candidato forma parte de una biblioteca de compuestos

- (por ejemplo, biblioteca de moléculas pequeñas o macromoléculas), preferentemente en donde el método comprende además aislar el agente candidato (por ejemplo, una molécula pequeña o una macromolécula) de la biblioteca, preferentemente en donde el agente candidato se une específicamente al polipéptido quimérico o al complejo polipeptídico quimérico, y/o preferentemente en donde el agente candidato se une específicamente a la proteína de fusión o al complejo de la proteína de fusión.
- 5 23. Un método para producir una molécula de unión a antígeno que sea inmunointeractiva con una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, en donde el método comprende: (1) inmunizar un animal con un polipéptido quimérico que contenga polipéptido de ectodominio de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1 a 8, o un complejo polipeptídico quimérico que contenga polipéptido de ectodominio de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19, o una composición de la misma de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el polipéptido de ectodominio corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura; (2) identificar y/o aislar un linfocito B del animal, que sea inmunointeractivo con la proteína de fusión o el complejo de la misma; y (3) producir la molécula de unión a antígeno expresada por ese linfocito B, o un derivado del mismo que tenga la misma especificidad de unión a epítopo que la molécula de unión a antígeno.
- 10 24. El método de la reivindicación 23, en donde la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo neutralizante), y/o en donde el derivado se selecciona de fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos monocatenarios (scFv) y de dominio (incluidos, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido), y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de unión/reconocimiento de antígeno.
- 15 25. Un complejo polipeptídico quimérico que contenga ectodominio de fusión de virus con envoltura, de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19, o una vacuna de ADN o replicón/vector viral capaz de expresar el complejo polipeptídico quimérico, para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria a una proteína de fusión de un virus con envoltura, o complejo de la proteína de fusión, o para tratar o impedir una infección por virus con envoltura, en donde una subunidad de polipéptido de ectodominio del complejo polipeptídico quimérico corresponde a la proteína de fusión del virus con envoltura.

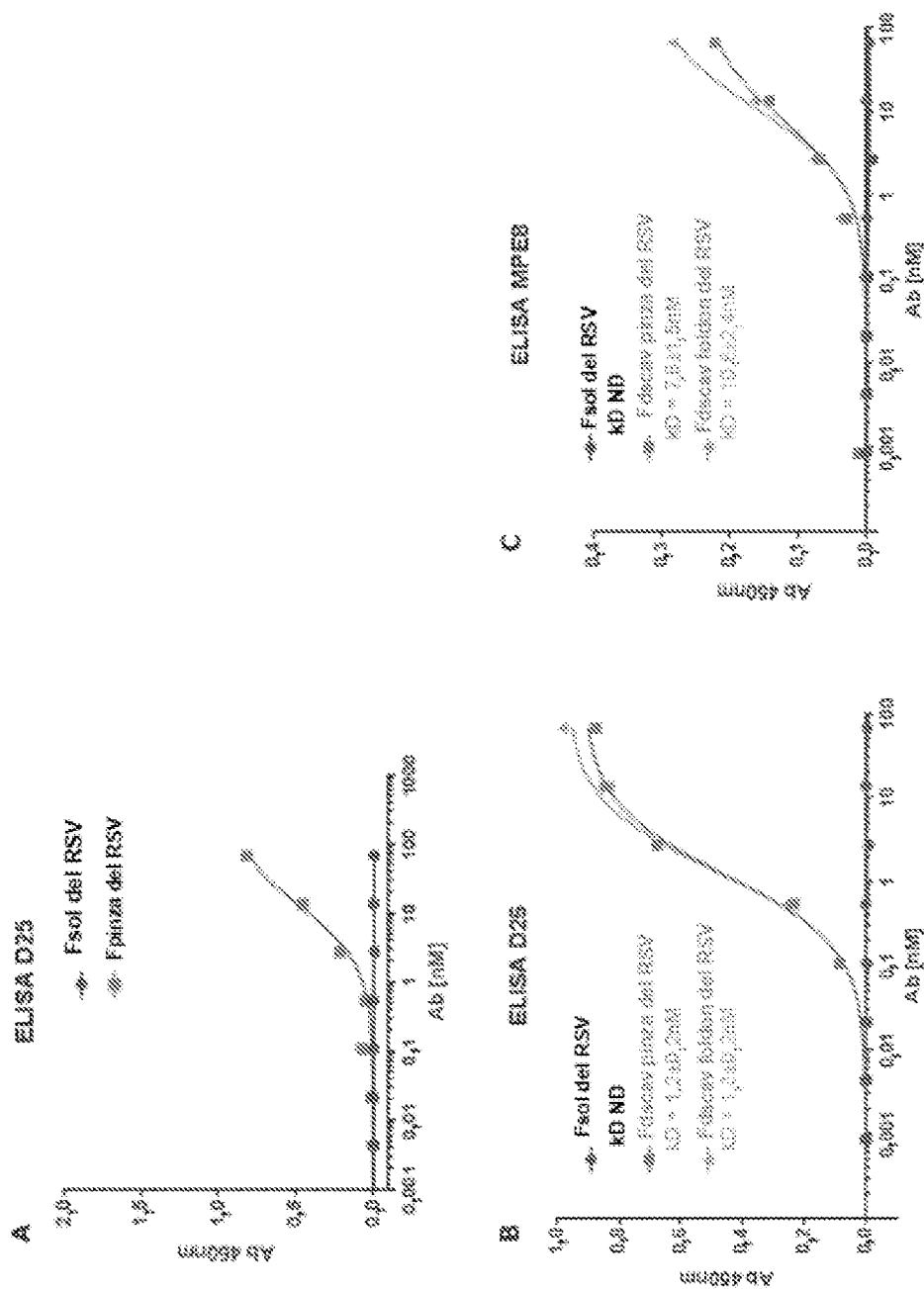


FIGURA 1

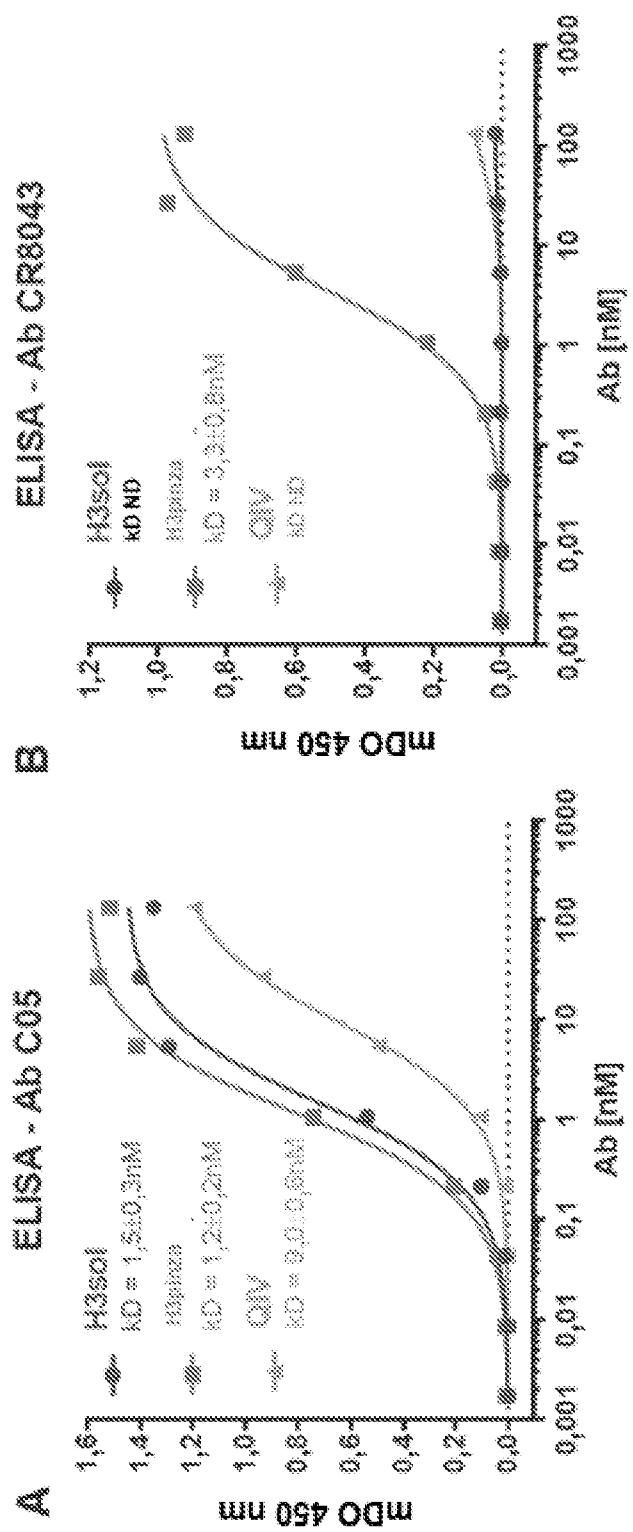


FIGURA 2

Cromatografía de exclusión por tamaño

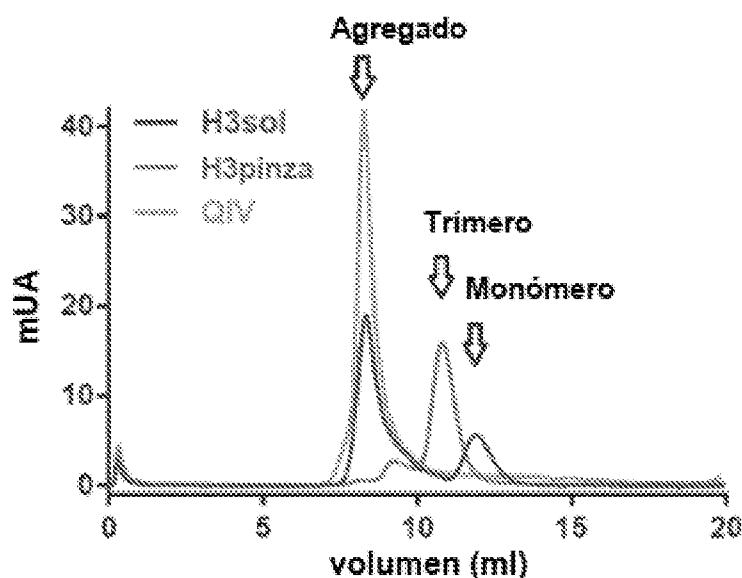


FIGURA 3

Neutralización de H3N2

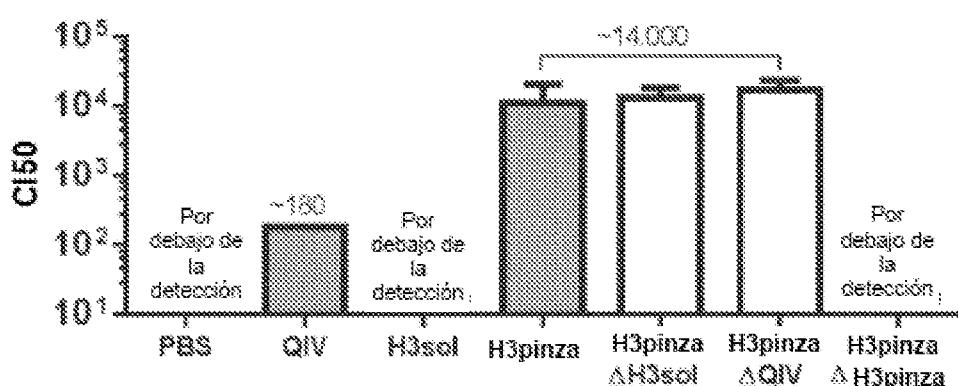


FIGURA 4

Especificidad de la respuesta inmunitaria inducida

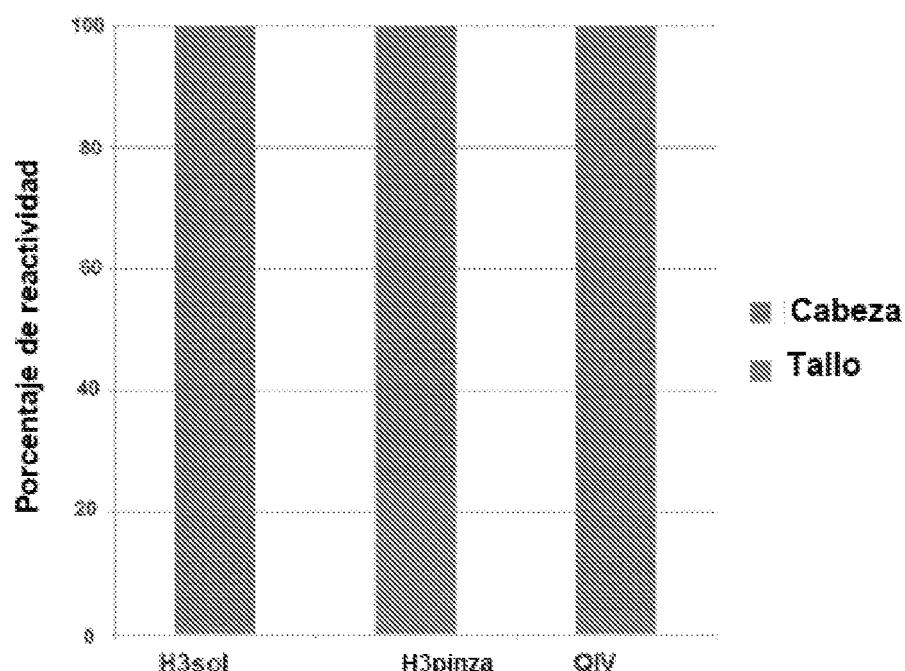


FIGURA 5

Reactividad cruzada con H5

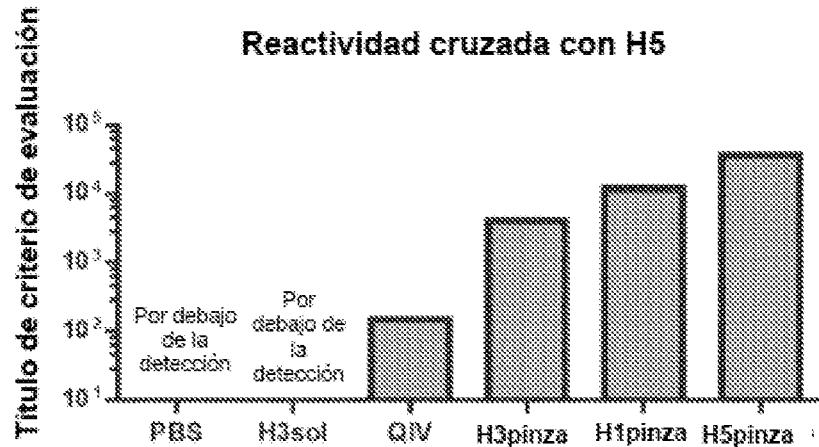


FIGURA 6

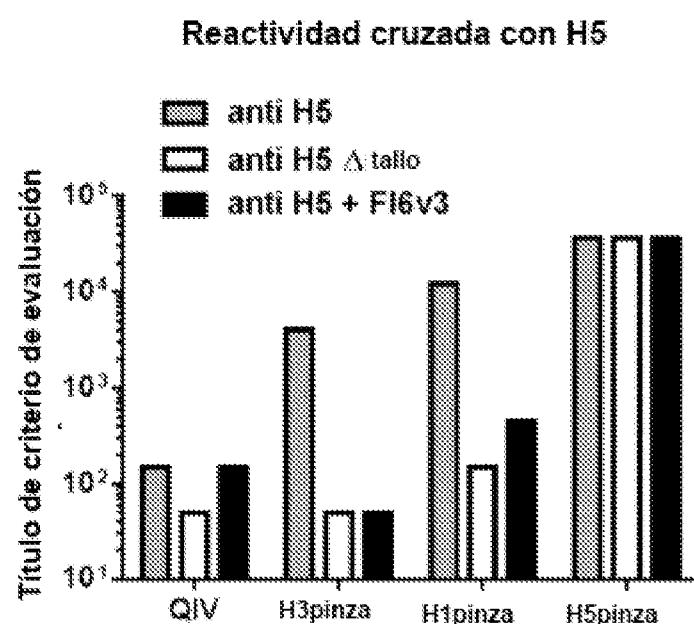


FIGURA 7

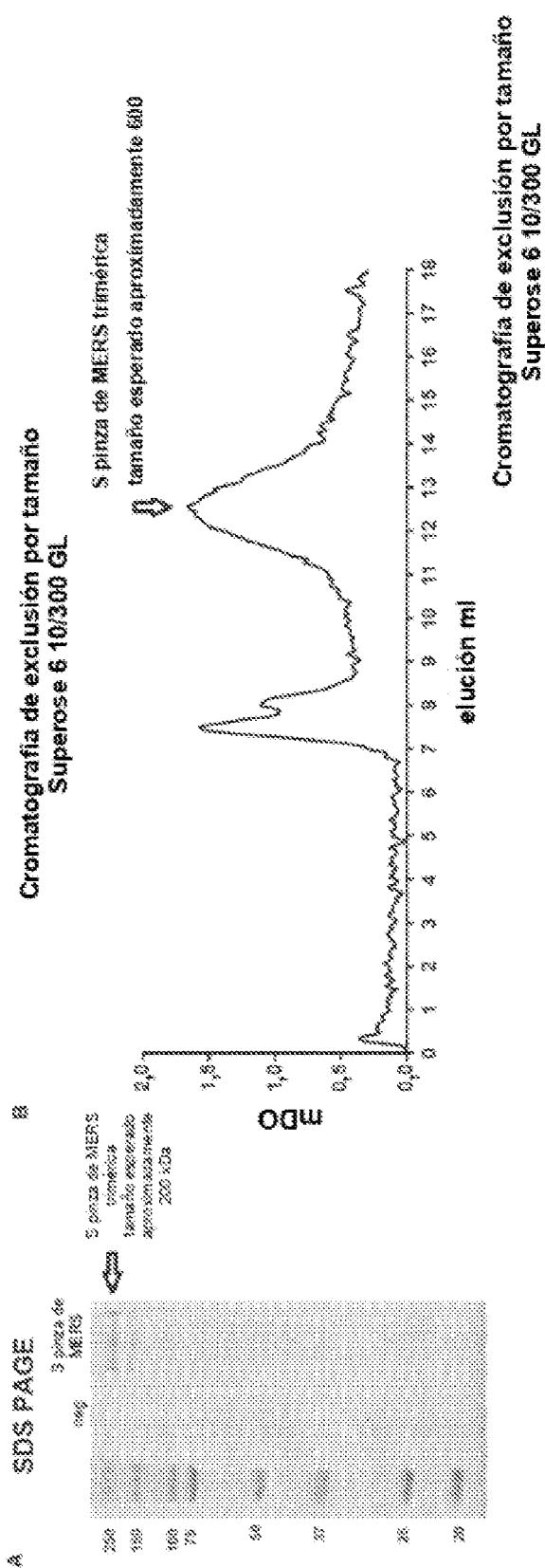


FIGURA 8

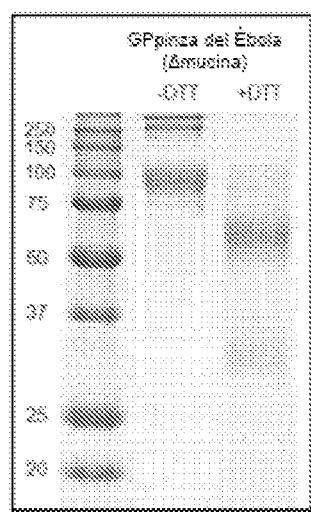


FIGURA 9

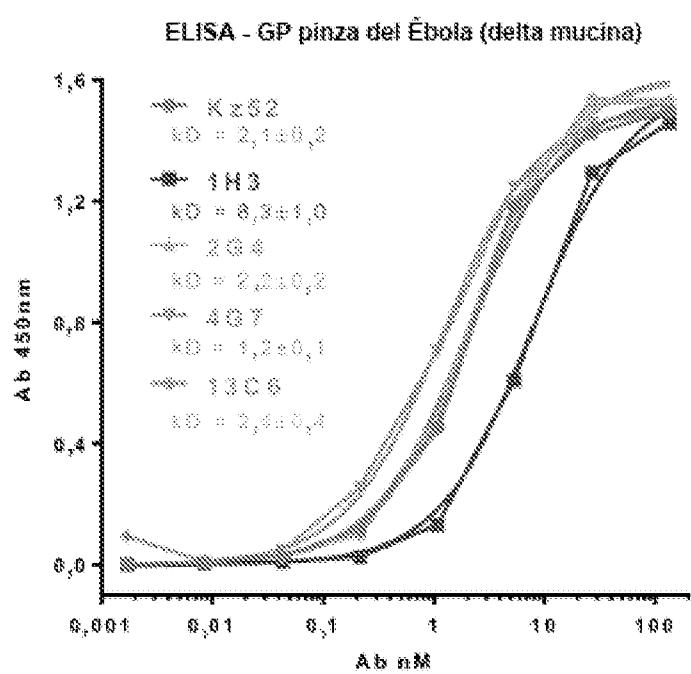


FIGURA 10

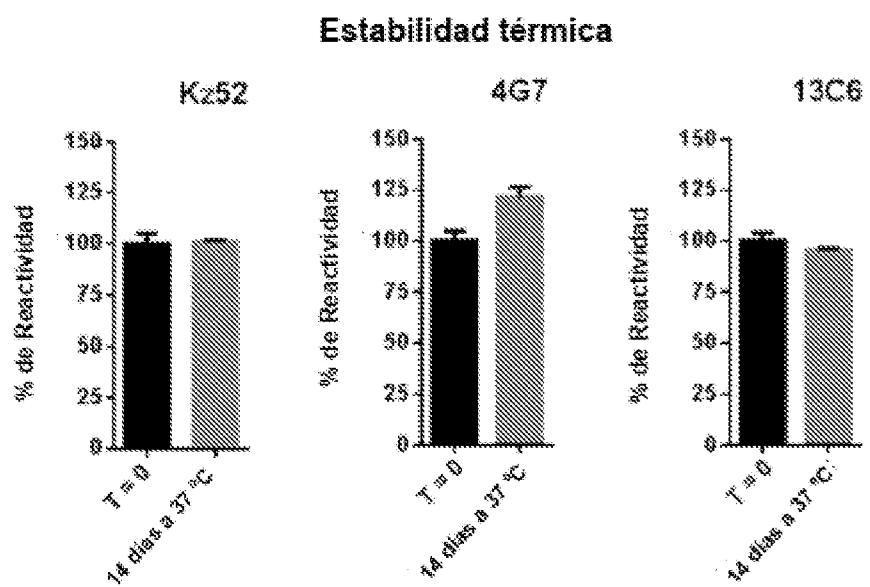


FIGURA 11

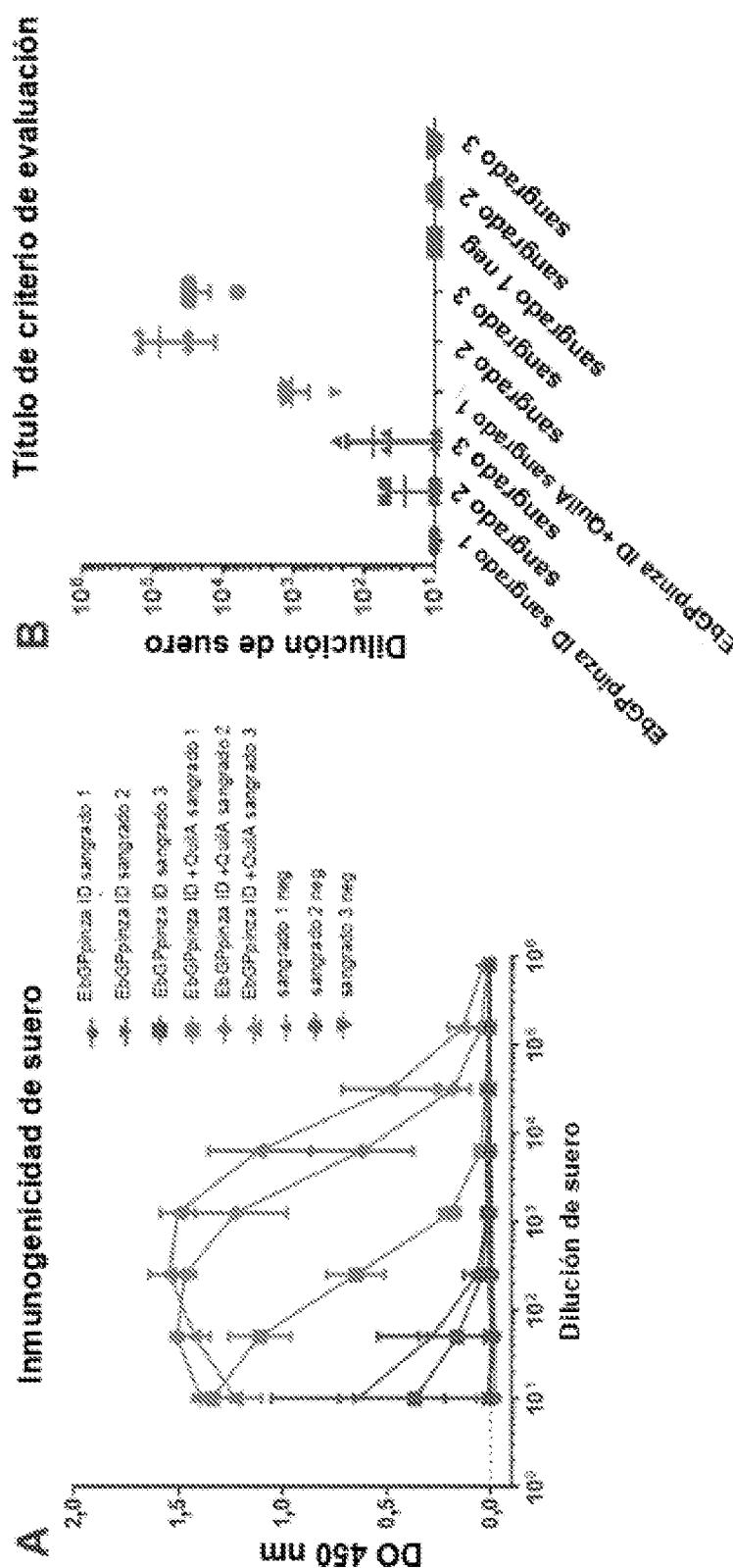


FIGURA 12

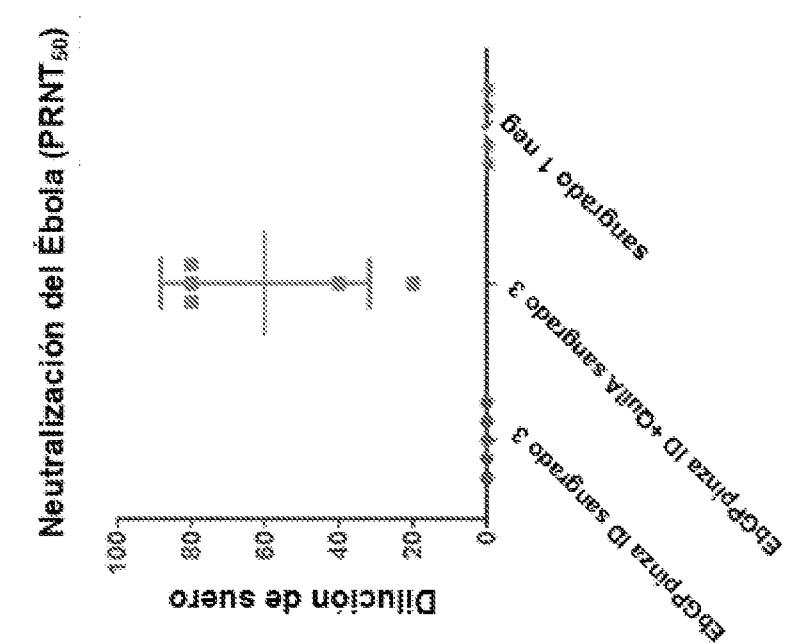


FIGURA 13

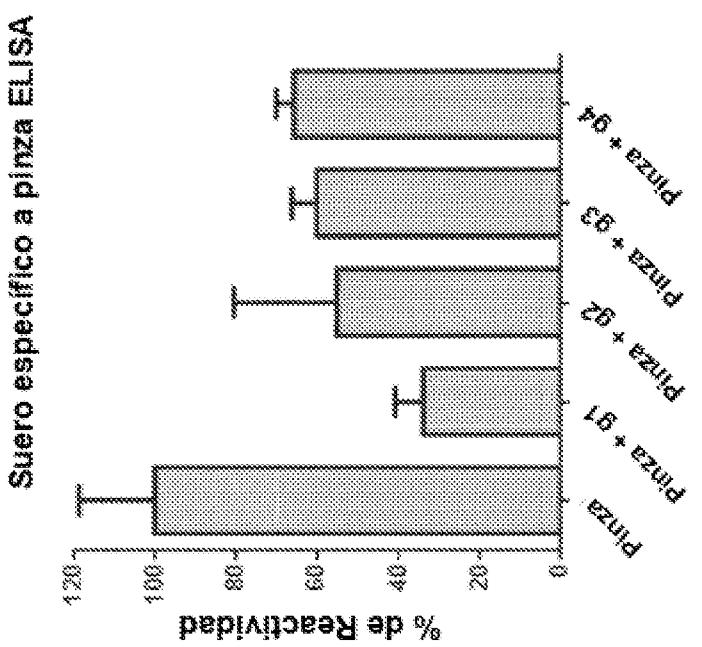


FIGURA 14

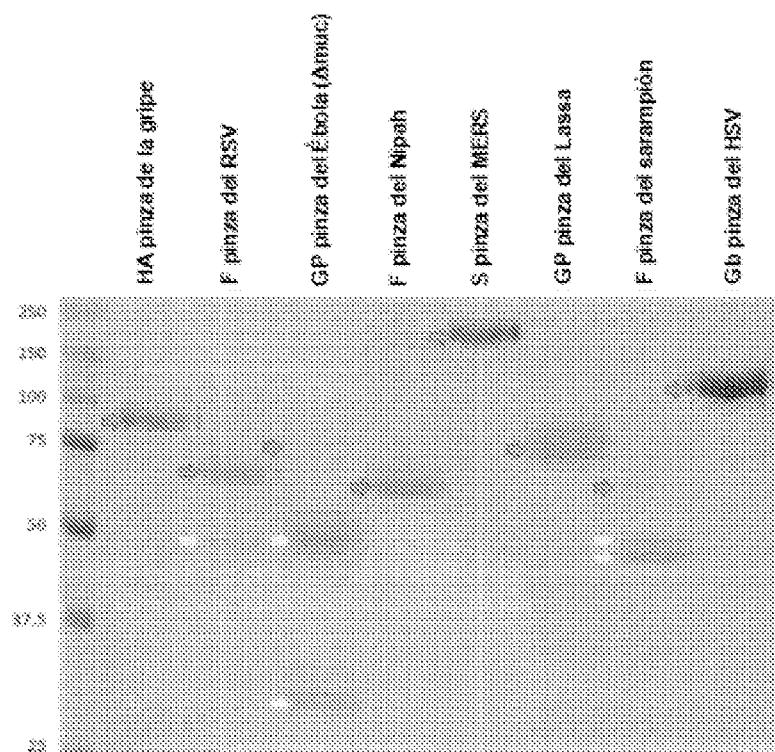


FIGURA 15

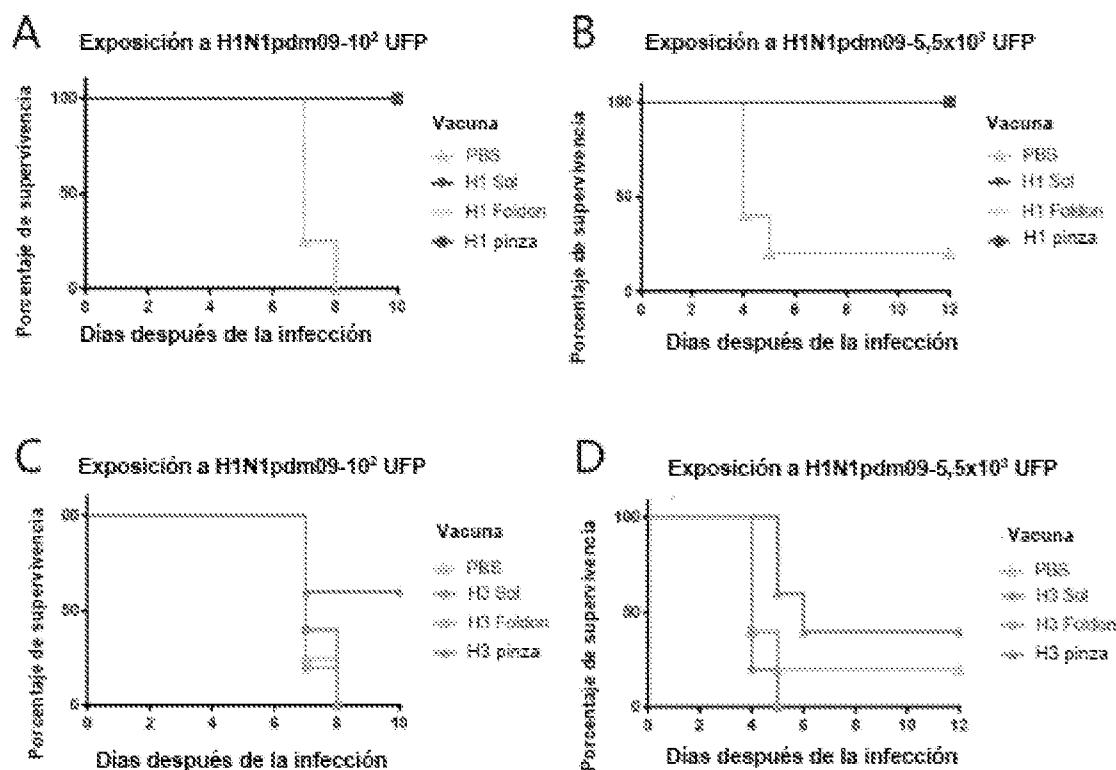


FIGURA 16

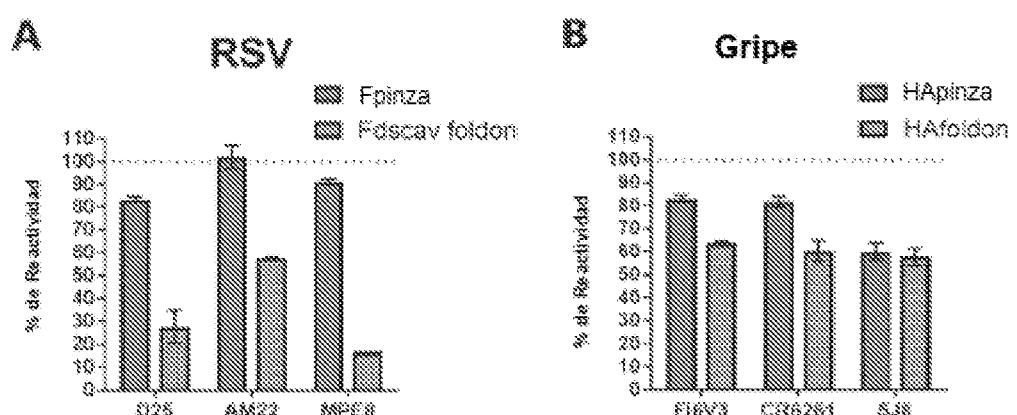


FIGURA 17

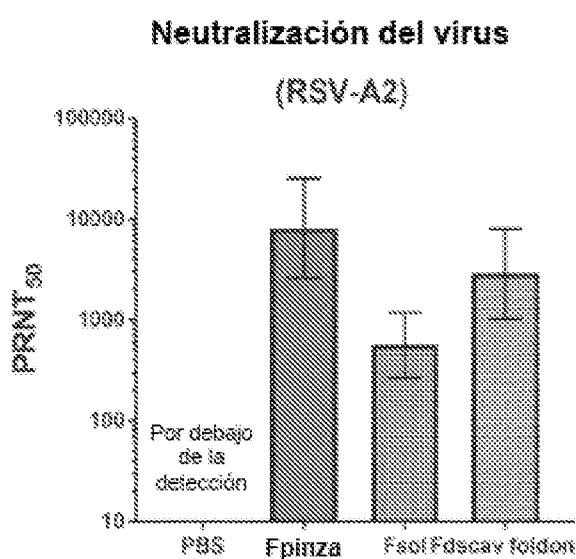


FIGURA 18

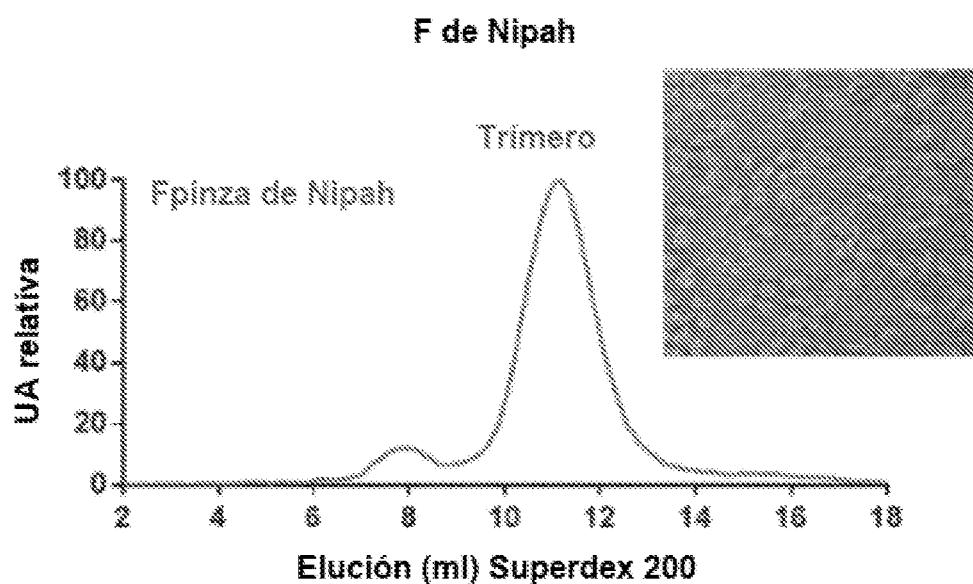


FIGURA 19

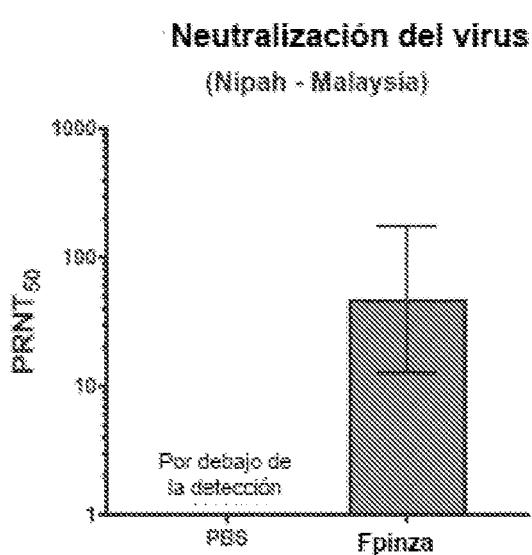


FIGURA 20

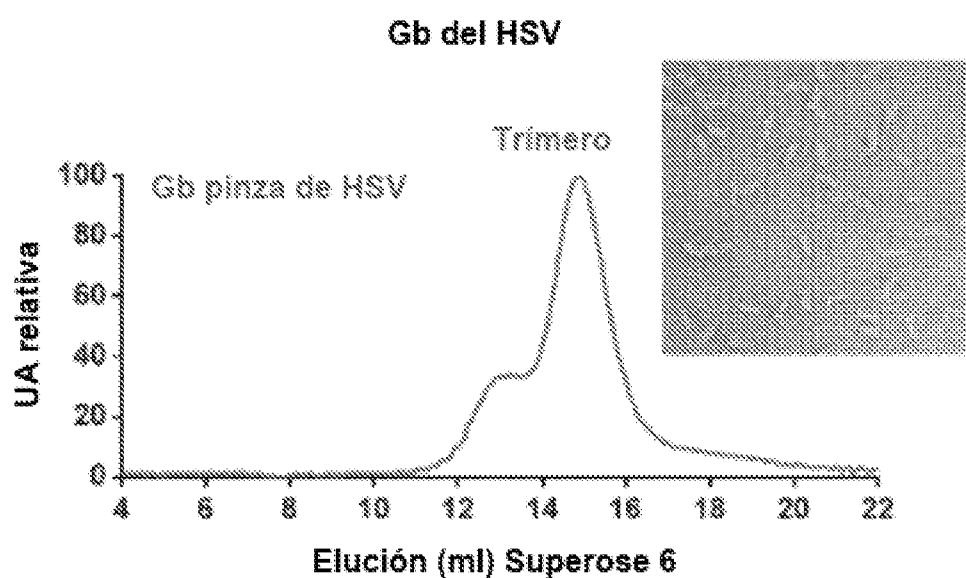


FIGURA 21