

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 677**

21 Número de solicitud: 201131316

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/135 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.02.2013

71 Solicitantes:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
C/ Monforte de Lemos, nº 5 Pabellón 6
28029 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**MELERO FONDEVILA, José Antonio y
PALOMO SANZ, Concepción**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Proteína F del VRSH en conformación pre-fusión estabilizada y anticuerpos neutralizantes específicos frente a la misma.**

57 Resumen:

Proteína F del VRSH en conformación pre-fusión estabilizada y anticuerpos neutralizantes específicos frente a la misma.

La presente invención proporciona una proteína de fusión (proteína F) del virus respiratorio sincitial humano (VRSH) en conformación pre-fusión estabilizada, útil para identificar o diseñar anticuerpos y otras moléculas que se unan a ella para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infecciones producidas por virus de la familia Paramyxoviridae, preferiblemente del género Pneumovirus, más preferiblemente por el VRSH. La presente invención se refiere también a un método de obtención de esta proteína así como a anticuerpos y a aptámeros frente a la misma, los cuales son útiles para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de las infecciones mencionadas.

ES 2 395 677 A1

DESCRIPCIÓN

Proteína F del VRSH en conformación pre-fusión estabilizada y anticuerpos neutralizantes específicos frente a la misma

5 La presente invención se encuadra en el campo de la biología molecular y la inmunología, específicamente se refiere a la proteína de fusión (proteína F) del virus respiratorio sincitial humano (VRSH) en conformación pre-fusión estabilizada y a anticuerpos frente a la misma.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 El virus respiratorio sincitial humano (VRSH) es el principal agente viral causante de enfermedades severas del tracto respiratorio en la población pediátrica en todo el mundo, y es también un patógeno de considerable importancia en adultos inmunodeprimidos así como en la población anciana. Este virus pertenece al género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae* que contiene también otros virus relevantes para los humanos, tales como los responsables del sarampión, las paperas y los recientemente descubiertos virus Hendra y Nipah.

15 Como todos los paramyxovirus, el VRSH es un virus encapsulado cuyo genoma consiste en una molécula de RNA de cadena sencilla que codifica para 11 proteínas. Dos de estas proteínas son las principales glicoproteínas de superficie del virión, las llamadas (i) proteína de anclaje (G), que media la unión del virus a la superficie celular, y (ii) proteína de fusión (F), que promueve la fusión de las membranas del virus y la célula con el objeto de permitir el inicio del ciclo infeccioso, pero también interviene en la fusión de la membrana de las células infectadas con la membrana de las células vecinas para formar sincitios.

20 Actualmente, no existen vacunas o agentes terapéuticos específicos contra el VRSH, y aunque en los años 60 se realizó un ensayo con una vacuna basada en el virus inactivado con formalina, ésta no solo no confirió protección frente al virus sino que además se asoció con un aumento de la enfermedad en la población pediátrica tras la infección con el VRSH (Kim, H.W. *et al.*, 1969, *Am J Epidemiol*, 89: 422-434). Los anticuerpos neutralizantes juegan un papel primordial en la protección frente a las infecciones provocadas por el VRSH. Las proteínas G y F son los únicos antígenos virales capaces de inducir anticuerpos neutralizantes así como de conferir protección a relativamente largo plazo en modelos animales (Stott, E.J. *et al.*, 1987, *J Virol*, 61: 3855-3861). La transferencia pasiva de estos anticuerpos protege a los ratones y a las ratas de algodón frente al VRSH (Graham, B.S. *et al.*, 1993, *Pediatr Res*, 34: 167-172; Prince, G.A. *et al.*, 1985, *Virus Res*, 3: 193-206). Además, en humanos existe una correlación positiva entre unos títulos altos de anticuerpos neutralizantes en suero y la protección de voluntarios adultos frente al VRSH (Hall, C.B. *et al.*, 1991, *J Infect. Dis*, 163: 693-698), y se ha observado una correlación inversa entre unos títulos altos de anticuerpos neutralizantes y el riesgo de infección por VRSH en niños (Glezen, W.P. *et al.*, 1986, *Am J Dis Child*, 140: 543-546) y ancianos (Falsey, A.R. & Walsh, E.E., 1998, *J Infect. Dis*, 177: 463-466). Estas observaciones promovieron el uso profiláctico de una preparación de inmunoglobulinas humanas (Respigam), la cual contiene altos títulos de anticuerpos neutralizantes, para prevenir infecciones por VRSH en la población infantil de alto riesgo (Groothuis, J.R. *et al.*, 1993, *N Engl J Med*, 329: 1524-1530). Posteriormente, Respigam fue reemplazado por un anticuerpo monoclonal humanizado (Palivizumab) dirigido contra la glicoproteína F del VRSH (The IMpact-RSV Study Group, 1998, *Pediatrics*, 102: 531-537).

25 La proteína F del VRSH es una glicoproteína tipo I que se ensambla como un homotrímero. Cada monómero es sintetizado como un precursor inactivo (F₀) que necesita ser cortado en dos sitios polibásicos (I y II) para convertirse en una proteína competente para la fusión (González-Reyes, L. *et al.*, 2001, *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.*, 98: 9859-9864). El sitio II es equivalente al sitio de corte único encontrado en otras proteínas F de otros paramyxovirus. Este sitio precede a un péptido de fusión hidrofóbico que es insertado en la membrana diana durante la fusión. Se ha postulado que las proteínas F de los paramyxovirus se mantienen en una conformación pre-fusión metaestable en la partícula viral hasta que el virus se une a la membrana de la célula diana. Es entonces cuando la proteína F se activa para iniciar una serie de cambios conformacionales que permiten que la fusión ocurra en el momento y lugar adecuados. Tras la fusión, la proteína F adquiere una conformación post-fusión altamente estable determinada en gran medida por la formación de un haz de seis hélices o "six-helix-bundle" (6HB) con secuencias de dos repeticiones de un patrón de siete aminoácidos o "heptad repeat" (HRA y HRB) desde cada monómero. La energía libre emitida mientras la proteína F transita desde la estructura pre-fusión a la post-fusión dirige el proceso de fusión de membranas.

30 Palivizumab, así como la mayoría de los anticuerpos monoclonales frente a la proteína F del VRSH descritos, reconoce la conformación post-fusión de esta proteína, representada en una forma de proteína F no anclada, llamada F_{TM}. (Calder, L.J. *et al.*, 2000, *Virology*, 271: 122-131). Esta proteína, modificada para eliminar la región transmembrana y la cola citoplasmática de F, es secretada al medio de cultivo y se pliega espontáneamente en la conformación post-fusión. Sin embargo, se ha visto que los anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconocen a F_{TM} son también capaces de inhibir la infectividad del virus si se preincuban con el mismo antes de que éste sea usado para infectar células, es decir, antes de que la proteína F se active para la fusión. Por tanto, es probable que la mayoría de los anticuerpos monoclonales descritos hasta la fecha frente a esta proteína F reconozcan epítopos compartidos por ambas conformaciones, pre y post-fusión.

65

Se ha comprobado también que preparaciones de inmunoglobulinas humanas (Ig) contienen anticuerpos frente a la proteína F del VRSH (anticuerpos α -F), los cuales pueden ser purificados por unión a F_{TM} covalentemente unida a cuentas de Sepharosa (Sastre, P. *et al.*, 2005, *J Med Virol*, 76: 248-255).

5 Por otro lado, mientras que la estructura de la proteína F del VRSH en su conformación post-fusión ha sido recientemente resuelta mediante cristalografía de rayos X (Swanson, K.A. *et al.*, 2011, *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.*, 108: 9619-9624; McLellan, J.S. *et al.*, 2011, *J Virol*), la disponibilidad de la conformación pre-fusión estabilizada es limitada debido a que la elevada inestabilidad de dicha conformación en la proteína silvestre dificulta su obtención en forma soluble. En este sentido, los intentos realizados hasta el momento para solubilizar esta forma pre-fusión no han aportado resultados satisfactorios, probablemente porque el estado metaestable de esta conformación facilita el repliegamiento espontáneo en la conformación post-fusión. A pesar de ello, algunos autores han conseguido disponer de la proteína F del VRSH en su conformación pre-fusión en estado soluble, mediante la sustitución de las secuencias aminoacídicas de los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína F por una cola de 6His y mediante la modulación de la molaridad del buffer empleado para la elución durante el proceso de purificación de esta proteína modificada (Chaiwatpongakorn, S. *et al.*, 2011, *J Virol*, 85: 3968-3977). Sin embargo, continúa siendo necesario disponer de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH en una forma estabilizada que facilite el estudio, tanto de anticuerpos neutralizantes, como de otro tipo de moléculas capaces de unirse específicamente a ella y de interferir con su activación. Dicha aproximación sería interesante desde un punto de vista clínico, ya que permitiría el diseño e identificación de nuevos agentes terapéuticos útiles para el tratamiento y/o profilaxis de infecciones provocadas por el VRSH, así como por otros paramyxovirus.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una proteína de fusión (proteína F) del virus respiratorio sincitial humano (VRSH) en conformación pre-fusión estabilizada, útil para identificar o diseñar anticuerpos y otras moléculas que se unan a ella para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infecciones producidas por virus de la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente del género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH. La presente invención se refiere también a anticuerpos y a aptámeros frente a esta proteína estabilizada en la conformación pre-fusión, los cuales son útiles para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de las infecciones mencionadas.

30 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una proteína F del VRSH en conformación pre-fusión que comprende las siguientes modificaciones:

- a. al menos un puente disulfuro intermonomérico en la región que comprende los aminoácidos 450 a 550 de su secuencia aminoacídica, y
- 35 b. al menos dos aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 106 a 109 de su secuencia aminoacídica y al menos cuatro aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 131 a 136 de su secuencia aminoacídica, sustituidos por asparagina o por glutamina.

40 De aquí en adelante se utilizará el término "proteína de la invención" para hacer referencia a la proteína F del VRSH en conformación pre-fusión descrita en el párrafo anterior.

45 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "proteína F del VRSH" se refiere a la glicoproteína de fusión del VRSH, implicada en la fusión de las membranas del virus y la célula y en la fusión de la membrana de las células infectadas con la membrana de las células vecinas para formar sincitios. Dentro del término "proteína F del VRSH" se incluye la proteína F de cualquier cepa del VRSH, aunque preferiblemente la proteína F del VRSH es la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 perteneciente a la cepa Long del VRSH.

50 Se entiende por "conformación pre-fusión" el estado metaestable en que se encuentran las proteínas F de los paramyxovirus en la partícula viral hasta que el virus se une a la membrana de la célula diana, es decir, el estado en que se encuentran dichas proteínas antes de sufrir los cambios conformacionales que desembocan en la conformación post-fusión.

55 Un "enlace disulfuro", "puente disulfuro" o "enlace SS (enlace azufre-azufre)" es un enlace covalente entre los grupos sulfhidrilo (-SH) de dos residuos de cisteína. La formación de estos enlaces estabiliza la estructura tridimensional de las proteínas. Por ello, la proteína de la invención comprende al menos un puente disulfuro intermonomérico en la región que comprende los aminoácidos 450 a 550 de su secuencia aminoacídica, lo que permite mantener entrecruzados sus tres monómeros. Los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 se encuentran conservados entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas F de las diferentes cepas del VRSH. Por ello, en una realización preferida, la proteína de la invención comprende dos puentes disulfuro intermonoméricos, más preferiblemente formados mediante la sustitución de los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 de su secuencia aminoacídica por cisteínas.

60 Además, la proteína de la invención comprende al menos uno de los aminoácidos básicos del punto de corte de furina situado en la región de su secuencia aminoacídica que comprende los residuos 106 a 109, y al menos uno de los aminoácidos básicos del punto de corte de furina situado en la región de su secuencia aminoacídica que comprende los

65

5 residuos 131 a 136, sustituidos por asparagina o por glutamina, para evitar el procesamiento proteolítico. Preferiblemente, la proteína de la invención comprende al menos dos aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 106 a 109 y al menos cuatro aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 131 a 136, sustituidos por asparagina o por glutamina. Estos dos puntos de corte de furina, aminoácidos 106 a 109 y aminoácidos 131 a 136, se encuentran conservados entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas F de las diferentes cepas del VRSH. Por ello, preferiblemente, la proteína de la invención comprende los aminoácidos básicos Arg106, Arg108, Arg109, Lys131, Lys132, Arg133, Lys134, Arg135 y Arg136 sustituidos por asparagina o por glutamina, más preferiblemente por asparagina.

10 En una realización más preferida, la proteína de la invención además comprende una cola de histidinas en su extremo C-terminal, para facilitar su purificación en columnas de Ni²⁺ durante su procedimiento de obtención. Más preferiblemente, esta cola de histidinas comprende 6 histidinas, aun más preferiblemente esta cola de histidinas se ha formado mediante la adición de la SEQ ID NO: 2 en el extremo C-terminal de la proteína de la invención.

15 Por tanto, preferiblemente la proteína de la invención comprende dos puentes disulfuro intermonoméricos formados mediante la sustitución de los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 de su secuencia aminoacídica por cisteínas, los aminoácidos básicos Arg106, Arg108, Arg109, Lys131, Lys132, Arg133, Lys134, Arg135 y Arg136 sustituidos por asparagina y la SEQ ID NO: 2 en su extremo C-terminal. A esta proteína también se hará referencia en la presente invención como "proteína FcN/2C-C" de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica para la proteína de la invención, de ahora en adelante "secuencia nucleotídica de la invención". Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica.

25 Los términos "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra. La secuencia nucleotídica de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencionales, o bien mediante secuenciación. Dicha secuencia nucleotídica, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarnos, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' y/o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de ellos o para permitir una mejor purificación del mismo.

30 La proteína de la invención presenta capacidad antigénica y por tanto puede utilizarse para desarrollar anticuerpos mono o policlonales que se unan específicamente a ella, lo cual puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo frente a la proteína de la invención, de ahora en adelante "primer anticuerpo de la invención".

35 Uno de los métodos que podría llevarse a cabo para obtener el primer anticuerpo de la invención consiste, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la inmunización de animales con la proteína de la invención y la posterior purificación de los anticuerpos específicos frente a la misma a partir de su suero. Otro método útil para tal fin es el que los inventores de la presente invención han empleado para obtener anticuerpos específicos frente a la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH, consistente en aislar el suero de conejos inmunizados con virus vaccinia recombinantes que expresan la proteína F completa y purificar los anticuerpos específicos de la conformación pre-fusión mediante la eliminación de aquellos anticuerpos que reconocen a la forma post-fusión de la proteína, lo cual han llevado a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, utilizando columnas de afinidad en las que una forma soluble de la proteína en la conformación post-fusión (F_{TM}) se encontraba covalentemente unida a Sepharosa. De este modo, seleccionaron los anticuerpos no unidos a dicha columna los cuales, como demuestran los ejemplos de la presente invención, presentan afinidad tanto por la proteína F silvestre del VRSH en conformación pre-fusión como por la proteína de la invención. Además, demuestran que este mismo método puede aplicarse a preparaciones de inmunoglobulinas humanas. Por tanto, este método es el preferiblemente empleado para obtener el primer anticuerpo de la invención.

40 Los inventores de la presente invención han demostrado que el primer anticuerpo de la invención, obtenido preferiblemente mediante el método descrito en el párrafo anterior, conserva la mayor parte de la actividad neutralizante presente en el suero de los conejos y en las preparaciones de inmunoglobulinas humanas, por lo que podría tener una eficacia mayor que otros anticuerpos en la intervención terapéutica contra el VRSH.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo frente a la proteína F del VRSH en conformación pre-fusión, de ahora en adelante "segundo anticuerpo de la invención". El segundo anticuerpo de la invención, por tanto, presenta especificidad frente a una proteína F del VRSH en conformación pre-fusión que no comprende las modificaciones descritas anteriormente para la proteína de la invención, es decir, frente a la forma silvestre de la proteína F del VRSH en conformación pre-fusión.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “neutralizar” se refiere a inhibir parcial o totalmente la actividad de una molécula, por ejemplo, aunque sin limitarnos, de una proteína, preferiblemente de la proteína F del VRSH, o de un organismo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, de un virus, preferiblemente del VRSH.

5 El término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína de la invención o con la proteína F silvestre del VRSH en conformación pre-fusión. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina o mediante técnicas de ingeniería genética conocidas en el estado de la técnica.

10 Los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína de la invención o de la proteína F silvestre del VRSH en conformación pre-fusión, y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. Usando la tecnología del ADN recombinante es posible construir un anticuerpo monoclonal humanizado uniendo una región variable o de reconocimiento antigénico del primer o segundo anticuerpo de la invención a un armazón de un anticuerpo humano. De este modo, se obtiene un anticuerpo humanizado que al ser administrado a un humano, no genera una respuesta anafiláctica por parte del sistema inmunitario.

25 En la mayoría de casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que los residuos de las regiones hipervariables del receptor se han sustituido por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

30 El término “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable”. Los residuos de sostén (en inglés “framework”) o “FR” son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable. En algunos casos, los residuos de sostén (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más la función del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o prácticamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, por lo menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), en general de una inmunoglobulina humana. Distintos procedimientos para la obtención de anticuerpos humanizados son conocidos en el estado de la técnica.

40 Por tanto, en una realización preferida, el primer y segundo anticuerpo de la invención son anticuerpos humanizados, aunque también pueden ser recombinantes, quiméricos, sintéticos o una combinación de cualquiera de los anteriores.

45 Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante para el primer o segundo anticuerpo de la invención, para la proteína de la invención o para la proteína F silvestre del VRSH en conformación pre-fusión, o que produce el primer o segundo anticuerpo de la invención, la proteína de la invención o la proteína F silvestre del VRSH en conformación pre-fusión como resultado de la recombinación homóloga. Dicha célula hospedadora incluye una célula en un cultivo celular “in vitro” así como una célula en un animal hospedador.

50 Los anticuerpos de la invención también pueden ser quiméricos. Así, una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

55 Otro aspecto de la invención se refiere a un aptámero frente a la proteína F del VRSH en conformación pre-fusión, de ahora en adelante “primer aptámero de la invención”. Otro aspecto de la invención se refiere a un aptámero frente a la proteína de la invención, de ahora en adelante “segundo aptámero de la invención”.

60 El término “aptámero” o “anticuerpo químico” se refiere a un ácido nucleico de cadena sencilla (ssDNA o RNA) aislado de genotecas de oligonucleótidos por selección *in vitro* mediante enriquecimiento exponencial en presencia del ligando

65

(método SELEX). Los aptámeros son capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a proteínas mediante un plegamiento tridimensional de su cadena. Generalmente, son obtenidos mediante su selección desde genotecas de oligonucleótidos combinatoriales, mediante el método SELEX (de sus siglas en inglés "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment"), que permitirá seleccionar aquel oligonucleótido de la genoteca utilizada que se une con más afinidad a la proteína diana. Estos oligonucleótidos tienen una región central de tamaño variable y con una secuencia aleatoria, y dos regiones flanqueantes de secuencia conocida. La longitud total del aptámero suele variar entre, por ejemplo, aunque sin limitarnos, los 70 y los 100 nucleótidos, incluyendo una secuencia fija o primer en cada extremo del aptámero para su amplificación por PCR (una de las fases del método de selección). La longitud de la región central con secuencia al azar suele estar comprendida entre, por ejemplo, aunque sin limitarnos, los 30 y 60 nucleótidos.

El "método SELEX" (Stoltenburg R. *et al.*, 2007, *Biomolecular Engineering*, 24: 381-403) comienza con la síntesis de una gran genoteca de oligonucleótidos, que consiste en secuencias de DNA o RNA generadas al azar y con un número de nucleótidos constante, en los que todas las secuencias tienen extremos constantes. Para una región aleatorizada de n nucleótidos, el número de posibles secuencias es 4^n . Las secuencias de la genoteca, se ponen en presencia del ligando diana. Entonces, mediante plegamientos tridimensionales, los diferentes oligonucleótidos podrán unirse a la diana o no. Las secuencias no enlazadas son eliminadas. Las secuencias enlazadas son eluidas y amplificadas por PCR (mediante los primers de los extremos) para la preparación de subsecuentes rondas de selección en las que se aumentará el rigor de las condiciones para identificar las secuencias que poseen la mejor propiedad química buscada (afinidad, inactivación de la proteína diana, etc.).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de la proteína de la invención, de ahora en adelante "método de la invención", que comprende:

- a. sustituir, en la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH, al menos dos aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 106 a 109 y al menos cuatro aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 131 a 136, por asparagina o por glutamina,
- b. introducir al menos un puente disulfuro intermonomérico en la región que comprende los aminoácidos 450 a 550 de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (a),
- c. expresar la proteína F del VRSH modificada en los pasos (a) y (b) en un sistema de expresión, y
- d. purificar la proteína expresada en el paso (c).

En una realización preferida, la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (a) del método de la invención es la SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, los aminoácidos básicos del paso (a) del método de la invención son Arg106, Arg108, Arg109, Lys131, Lys132, Arg133, Lys134, Arg135 y Arg136 y se sustituyen por asparagina.

La introducción de puentes disulfuro en una secuencia de aminoácidos se puede llevar a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante la adición a dicha secuencia de al menos dos residuos de cisteína lo suficientemente próximos como para que puedan formar un enlace covalente entre sus grupos sulfhidrilo (-SH), o bien mediante la sustitución de al menos dos residuos de la secuencia aminoacídica por residuos de cisteína. Los dos residuos de cisteína que forman el puente pueden estar separados por muchos aminoácidos en la secuencia o bien pueden pertenecer a diferentes cadenas polipeptídicas; el plegamiento de la(s) cadena(s) polipeptídicas lleva a los residuos de cisteína a estar muy próximos, lo que permite la formación del enlace disulfuro. Por tanto, la introducción de al menos un puente disulfuro intermonomérico en la región que comprende los aminoácidos 450 a 550 de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (a) del método de la invención, se puede llevar a cabo mediante la sustitución de al menos dos de los residuos comprendidos en esta región por cisteínas. En otra realización preferida, en el paso (b) del método de la invención se introducen dos puentes disulfuro intermonoméricos, más preferiblemente mediante la sustitución de los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (a) del método de la invención por cisteínas.

Un "sistema de expresión" es cualquier molécula de ácido nucleico en la que se puede integrar otro fragmento de DNA o RNA sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de sistemas de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales, como por ejemplo, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), o vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de DNA o RNA con capacidad para replicarse en el interior de una célula, procarionota o eucarionota. En otra realización preferida, el sistema de expresión del paso (c) del método de la invención es el virus vaccinia.

Son conocidos en el estado de la técnica diversos métodos de purificación de proteínas que podrían llevarse a cabo en el método de la invención, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, métodos electroforéticos o cromatográficos. Estos últimos incluyen filtración o exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad, y pueden realizarse tanto en columna, como en papel o en placa. Por tanto, en otra

5 realización preferida, el método de la invención además comprende añadir una cola de histidinas en el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (b). En una realización más preferida, la cola de histidinas comprende 6 histidinas, más preferiblemente esta cola de histidinas se añade mediante la adición de la SEQ ID NO: 2 en el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (b) del método de la invención. De este modo, la purificación de la proteína en el paso (d) del método de la invención se lleva a cabo, preferiblemente, mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de Ni²⁺, ya que esta cola de histidinas añadida en el extremo C-terminal de la proteína presenta afinidad por los iones de Ni²⁺.

10 La proteína de la invención se encuentra en forma estabilizada, por lo que es útil para la identificación o el diseño de anticuerpos y otras moléculas que se unan específicamente a ella. Dichos anticuerpos y moléculas frente a la proteína de la invención son interesantes desde un punto de vista clínico, ya que presentan la capacidad de interferir con la actividad biológica de la proteína F del VRSH en su conformación pre-fusión, *in vivo* o *in vitro*, lo que impide que se produzca el proceso de fusión de las membranas del virus y de la célula diana, evitando por tanto el desarrollo del ciclo infectivo.

15 Además, dado que los virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae* son afines en cuanto a su evolución, la homología global de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína F es elevada entre la mayoría de los virus pertenecientes a esta familia. Asimismo, dentro de los virus pertenecientes al género *Pneumovirus* existe un elevado nivel de homología entre las secuencias aminoacídicas de sus proteínas F, por ejemplo, la homología entre estas secuencias en el virus respiratorio sincitial (VRS) caprino, ovino, humano y bovino es de al menos un 70%. Además, entre los subgrupos A y B del VRSH existe una homología del 89% en dicha secuencia aminoacídica. Por todo ello, se espera que los compuestos o composiciones capaces de unirse específicamente a la proteína de la invención, y por tanto de interactuar con su actividad biológica, sean también capaces de unirse a otras proteínas F en conformación pre-fusión de otros virus pertenecientes a esta familia y a este género. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención para la identificación o diseño de compuestos o composiciones para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. En una realización preferida, el virus pertenece al género *Pneumovirus*. En una realización más preferida, el virus es el VRSH.

30 En un método de identificación o diseño de los compuestos o composiciones mencionados en el párrafo anterior mediante el uso de la proteína de la invención, éstos se podrían clasificar como útiles para el diagnóstico de las infecciones mencionadas cuando son capaces de unirse específicamente a la proteína de la invención, independientemente de si interfieren o no con su actividad biológica. De igual modo, en dicho método estos compuestos o composiciones se podrían clasificar como útiles para la prevención y/o el tratamiento de las infecciones mencionadas cuando son capaces de unirse a la proteína de la invención y de alterar, reducir o inhibir parcial o totalmente su actividad biológica.

40 La familia de virus "*Paramyxoviridae*" comprende paramyxovirus que poseen un genoma consistente en una molécula de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa. Estos virus albergan la información genética en una cápside cubierta por una envoltura viral y estructuralmente definida por una simetría helicoidal. Son virus pleomórficos. Ejemplos de géneros comprendidos en esta familia son, aunque sin limitarnos, *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Pneumovirus* o *Metapneumovirus*. El género "*Pneumovirus*" comprende virus ARN pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, virus de la neumonía del ratón, Virus Respiratorio Sincitial Bovino, caprino, ovino o humano (VRSH). El "VRSH" es el virus de la familia de los paramixovirus (*Paramyxoviridae*), género *Pneumovirus*, que causa infección del tracto respiratorio y puede producir solo síntomas menores, indistinguibles de un resfriado común o enfermedades menores, o en el caso de los niños puede causar bronquiolitis, produciendo un cuadro respiratorio grave que puede requerir hospitalización y, con muy poca frecuencia, la muerte.

50 Se entiende por "infección" en la presente invención la invasión o colonización de cualquier tejido de un hospedador por parte de un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

55 Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína de la invención presenta capacidad antigénica y, por tanto, puede utilizarse también para inmunizar a un animal, preferiblemente a un mamífero, más preferiblemente a un humano, frente a infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente por virus pertenecientes al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

60 Además, la proteína de la invención también es de utilidad para la detección de anticuerpos frente a la proteína F de virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente al género *Pneumovirus*, más preferiblemente del VRSH. Así, la proteína de la invención es también útil para el diagnóstico *in vitro* (en una muestra biológica aislada) de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente pertenecientes al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, a la proteína de la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. En una realización más preferida, el virus pertenece al género *Pneumovirus*. En una realización aun más preferida, el virus es el VRSH. En una realización aun más preferida, el medicamento es una vacuna.

El término “vacuna” se refiere a una preparación epitópica o antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmunológico frente a una infección. Son preparados de antígenos o epítomos que, una vez dentro del organismo, provocan la respuesta del sistema inmunitario mediante la producción de anticuerpos y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria. La vacuna de la invención puede administrarse al individuo una sola vez o en repetidas ocasiones (administración inicial y subsecuentes), dependiendo de la capacidad del individuo para producir una respuesta inmunológica en respuesta a la administración de la vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del primer o segundo anticuerpo de la invención o del primer o segundo aptámero de la invención para la detección de la proteína F de virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. En una realización preferida, el virus pertenece al género *Pneumovirus*. En una realización más preferida, el virus es el VRSH. Así, el primer o segundo anticuerpo de la invención y el primer o segundo aptámero de la invención son de utilidad para el diagnóstico *in vitro* (en una muestra biológica aislada) de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente pertenecientes al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende la proteína de la invención, el primer anticuerpo de la invención, el segundo anticuerpo de la invención, el primer aptámero de la invención y/o el segundo aptámero de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico *in vitro* de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. En una realización preferida, el virus pertenece al género *Pneumovirus*. En una realización más preferida, el virus es el VRSH.

El kit de la invención puede comprender además, sin ningún tipo de limitación, sondas, tampones, enzimas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras proteínas que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el diagnóstico *in vitro* de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

Opcionalmente, al menos uno de los anticuerpos o de los aptámeros, o la proteína de la invención, en el kit de la invención está marcado o inmovilizado. Preferiblemente, al menos uno de los anticuerpos o de los aptámeros, o la proteína de la invención, en el kit de la invención está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima o un sustrato de una enzima. Más preferiblemente, al menos uno de los anticuerpos o de los aptámeros, o la proteína de la invención, en el kit de la invención está inmovilizado.

El término “inmovilizado”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo, el aptámero o la proteína de la invención pueden ser unidos a un soporte sin perder su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz, (por ejemplo, una matriz de nylon), una placa de microvaloración (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte de plástico similar, o bien cuentas (*esferas*, por ejemplo, *esferas* de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del primer o segundo anticuerpo de la invención o del primer o segundo aptámero de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, al primer o segundo anticuerpo de la invención o al primer o segundo aptámero de la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*. En una realización más preferida, el virus pertenece al género *Pneumovirus*. En una realización aun más preferida, el virus es el VRSH.

Los medicamentos a los que se refiere la presente invención pueden ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

Los medicamentos de la invención pueden ser administrados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, de manera profiláctica antes de que se produzca la infección para prevenir la misma; o bien de manera posterior a la exposición del individuo al patógeno para eliminar o mantener latente la enfermedad o para prevenir su reactivación.

Los medicamentos de la invención pueden administrarse en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, oral, rectal, parenteral (intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter).

Además, los medicamentos de la invención pueden utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de infecciones producidas por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la infección producida por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH, en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología; o
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

El término "diagnóstico" se refiere a determinar la ausencia o presencia de la infección producida por virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, preferiblemente al género *Pneumovirus*, más preferiblemente por el VRSH.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra los resultados de los ensayos de ELISA y de neutralización con los sueros y los anticuerpos de conejo. (a y b) Diluciones seriadas de sueros de conejos inoculados con Vac/Fc (α -Fc) o Vac/ F_{TM^-} (α - F_{TM^-}) se probaron para unión a proteína F_{TM^-} adsorbida a placas (a) o para neutralización del VRSH (b). Sueros de conejos pre-inmunes se incluyeron como controles. Los resultados son la media \pm desviación estándar (DS) de grupos de 2-3 conejos y son representativos de tres experimentos independientes. (c y d) Los anticuerpos α -Fc totales se purificaron por cromatografía sobre proteína A-Sepharosa a partir de los sueros de los conejos inmunizados con Vac/Fc. Los anticuerpos α -Fc se cargaron en una columna de F_{TM^-} -Sepharosa y los anticuerpos no retenidos (α -Fc/ ΔF_{TM^-}) se recogieron y guardaron. Después de lavar la columna, los anticuerpos retenidos (α -Fc/ F_{TM^-}) se eluyeron con 0,1 M Glicina-HCl, pH 2,5 y se neutralizaron con Tris saturado. Los anticuerpos α -Fc, α -Fc/ ΔF_{TM^-} y α -Fc/ F_{TM^-} se probaron para unión a F_{TM^-} (c) y para neutralización del VRSH (d). (e y f) Los anticuerpos α - F_{TM^-} totales de los conejos inoculados con Vac/ F_{TM^-} se procesaron de forma similar para producir los anticuerpos α - F_{TM^-} / ΔF_{TM^-} que no se unieron a la columna de F_{TM^-} -Sepharosa y los anticuerpos α - F_{TM^-} / F_{TM^-} eluidos de dicha columna. Los anticuerpos α - F_{TM^-} , α - F_{TM^-} / ΔF_{TM^-} y α - F_{TM^-} / F_{TM^-} se probaron para unión a F_{TM^-} (e) y neutralización de VRSH (f).

Fig. 2. Muestra cómo los anticuerpos α -Fc de conejo reconocen a la proteína F del VRSH en la superficie celular incluso si se han deplecionado de los anticuerpos capaces de unirse a F_{TM^-} . Células HEp-2 se infectaron con VRSH (cepa Long, 5 unidades infecciosas/célula) y se probaron 48 horas más tarde por citometría para el marcaje de la superficie celular con los anticuerpos α -Fc, α -Fc/ ΔF_{TM^-} y α -Fc/ F_{TM^-} (a). Alternativamente, células HEp-2 se infectaron con recombinantes del virus vaccinia que expresan la proteína P del VRSH (Vac/P) o la proteína Fc del VRSH (Vac/Fc) y se probaron 24 horas más tarde por citometría para el marcaje de la superficie celular con los anticuerpos α -Fc, α -Fc/ ΔF_{TM^-} y α -Fc/ F_{TM^-} (b) o después de la adsorción de los anticuerpos a células infectadas con Vac/P (c) o Vac/Fc (d). Células sin infectar (control, línea discontinua) se incluyeron siempre como control. A destacar la reactividad de α -Fc/ F_{TM^-} con células infectadas con Vac/P (parte b, panel derecho; aunque menor que la reactividad de α -Fc, α -Fc/ ΔF_{TM^-}) probablemente porque algunos anticuerpos anti-vaccinia se unieron inespecíficamente a la columna de F_{TM^-} . Los resultados de esta figura son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Fig. 3. Muestra cómo los anticuerpos α -Fc, α -Fc/ ΔF_{TM^-} y α -Fc/ F_{TM^-} pierden su actividad neutralizante después de la incubación con células infectadas con Vac/Fc. Las tres preparaciones de anticuerpos de la Figura 2 se deplecionaron de anticuerpos que se uniesen a células infectadas con Vac/P o con Vac/Fc y se probaron antes o después de las adsorciones para la unión a F_{TM^-} (a, b y c) o para neutralización del VRSH (d, e y f). Los resultados son medias \pm DS y son representativos de tres experimentos independientes.

Fig. 4. Muestra la estabilización de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH con puentes disulfuro intermonoméricos. (a) Modelo tri-dimensional de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH hecho con las coordenadas de la proteína F del virus de la parainfluenza tipo 5 (PDB código, 2B9B). Los residuos de Cisteína (C) que reemplazan a los residuos 481, 489, 509 y 510 están representados por bolas en dos de los monómeros. (b) Estructura post-fusión de la proteína F del VRSH (PDB, 3RRR). Los residuos de Cys introducidos son como en la parte (a). Las proteínas FcN, FcN/2C-C y la proteína F_{TM^-} se analizaron mediante SDS-PAGE que bien se tiñó con azul de Coomassie (c) o se electrotransferieron a membranas de nylon que se tiñeron por "western blot" con anticuerpos α - F_{TM^-} (d). Las tres proteínas purificadas se adsorbieron a películas de carbono y se tiñeron con acetato de uranilo para microscopía electrónica (e, f y g). La barra corresponde a 50 nm.

Fig. 5. Muestra cómo la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH estabilizada se une a anticuerpos de conejo y humanos deplecionados de aquellos que reconocen a la F_{TM^-} . (a) Las tres proteínas, F_{TM^-} , FcN y FcN/2C-C de la Figura 4 se unieron a placas de ELISA mediante un puente hecho con el anticuerpo monoclonal (AcM) 101F y se probaron para la unión de los anticuerpos que se indican en cada panel. Los anticuerpos α -6HB se prepararon en conejos inoculados con una construcción expresada en bacterias que mimetiza al haz de seis hélices presente en la forma post-fusión de la proteína F del VRSH. (b) RG es la preparación de Ig humanas (Respigam). Esta preparación se deplecionó también de anticuerpos que se uniesen a F_{TM^-} -Sepharosa (RG/ ΔF_{TM^-}), a células infectadas con un recombinante del virus vaccinia que expresa la proteína G del VRSH (RG/ ΔF_{TM^-} / ΔG) y finalmente a células infectadas con Vac/Fc (RG/ ΔF_{TM^-} / ΔG / ΔFc) y todas estas preparaciones de anticuerpos se usaron en un ensayo de microneutralización con el VRSH. C-: Control. (c) Las proteínas FcN y FcN/2C-C se adsorbieron directamente a placas de microtitulación y se usaron en un ELISA con los AcM indicados en cada panel. Los anticuerpos 2F, 47F y 101F son de origen murino y reconocen epítomos no solapantes. Palivizumab es un AcM humanizado que selecciona cambios de aminoácidos en mutantes de escape que solapan parcialmente con los seleccionados por el 47F y ambos anticuerpos unen péptidos similares de la proteína F del VRSH.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención en la estabilización de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH, así como de los anticuerpos frente a la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH para neutralizar el virus. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Estabilización de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH y obtención de anticuerpos frente a la misma.

1. 1. RESULTADOS.

Inducción de anticuerpos neutralizantes con recombinantes del virus vaccinia que expresan las proteínas F o F_{TM^-} del VRSH. Conejos "New Zealand" se inocularon i.m. con 10^6 unidades infectivas de recombinantes del virus vaccinia que expresan una forma completa de la proteína F del VRSH (Vac/Fc) o un mutante de esa proteína sin la región transmembranal (Vac/ F_{TM^-}). Los resultados representativos de cada grupo de conejos que se muestran en la Figura 1 demostraron que ambos sueros contenían anticuerpos capaces de unirse a la proteína F_{TM^-} en un ELISA (Fig. 1a) y de inhibir la infectividad del VRSH en un ensayo de microneutralización (Fig. 1b). Sin embargo, los sueros de los conejos inoculados con Vac/Fc neutralizaron al VRSH significativamente mejor que el suero de los conejos inoculados con Vac/ F_{TM^-} .

Los anticuerpos de los conejos inoculados con Vac/Fc (denominados α -Fc) se purificaron con proteína A-Sepharosa y se cargaron posteriormente en una columna de proteína F_{TM^-} unida covalentemente a bolitas de Sepharosa. Los anticuerpos que no se unieron a la columna (α -Fc/ ΔF_{TM^-}) no reaccionaron con la proteína F_{TM^-} en un ELISA (Fig. 1c), mientras que los anticuerpos α -Fc/ F_{TM^-} eluidos de la columna se unieron a F_{TM^-} incluso más eficientemente que los anticuerpos de partida (α -Fc). De manera significativa, aunque los anticuerpos α -Fc/ F_{TM^-} inhibieron la infectividad del VRSH en un ensayo de neutralización, los anticuerpos α -Fc/ ΔF_{TM^-} no retenidos mantuvieron la mayor parte de la actividad neutralizante de los anticuerpos α -Fc originales (Fig. 1d). Considerando que los anticuerpos eluidos de la columna de afinidad son específicos para F_{TM^-} mientras que los anticuerpos α -Fc y α -Fc/ ΔF_{TM^-} deben tener múltiples especificidades presentes en el suero de un conejo, los resultados de la Fig. 1c y 1d ponen de relieve la capacidad neutralizante de los anticuerpos α -Fc/ ΔF_{TM^-} .

Los anticuerpos de los conejos inoculados con Vac/ F_{TM^-} (denominados $\alpha-F_{TM^-}$) se procesaron de manera similar a los anticuerpos $\alpha-Fc$. De nuevo, los anticuerpos no retenidos en la columna de F_{TM^-} ($\alpha-F_{TM^-}/\Delta F_{TM^-}$) no se unieron a esta proteína en un ELISA mientras que los anticuerpos eluidos de la columna se unieron a F_{TM^-} más eficientemente que el material de partida ($\alpha-F_{TM^-}$) (Fig. 1e). Sin embargo, en este caso los anticuerpos no unidos a la columna de F_{TM^-} fueron incapaces de neutralizar la infectividad del VRSH (Fig. 1f) en clara diferencia con los anticuerpos equivalentes obtenidos de conejos inoculados con Vac/Fc (comparar Fig. 1d y 1f). Además, los anticuerpos $\alpha-F_{TM^-}$ eluidos de la columna ($\alpha-F_{TM^-}/F_{TM^-}$) y los anticuerpos de partida ($\alpha-F_{TM^-}$) fueron significativamente menos neutralizantes que los anticuerpos correspondientes obtenidos de conejos inoculados con Vac/Fc (comparar los ejes-x de las Fig. 1d y 1f).

Caracterización de la capacidad neutralizante de los anticuerpos $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$. Se hicieron varias pruebas con el fin de confirmar que la actividad neutralizante de los anticuerpos $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ era debida a anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína F del VRSH y no a reacciones cruzadas inesperadas.

Primero, la reactividad de los anticuerpos $\alpha-Fc$, $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ y $\alpha-Fc/F_{TM^-}$ se probó por citometría de flujo con células HEp-2 infectadas con VRSH. Como se ve en la Fig. 2a los anticuerpos $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ se unieron a la superficie de células infectadas con VRSH, aunque el nivel de fluorescencia era menor que el alcanzado con $\alpha-Fc$ y $\alpha-Fc/F_{TM^-}$.

Para excluir reacciones cruzadas no deseadas con anticuerpos α -vaccinia, las preparaciones de $\alpha-Fc$, $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ y $\alpha-Fc/F_{TM^-}$ se adsorbieron a células HEp-2 infectadas con un recombinante de vaccinia que expresa la fosfoproteína (P) del VRSH (Vac/P). Antes de la adsorción, las tres preparaciones de anticuerpos reaccionaron positivamente con las células infectadas con Vac/Fc o Vac/P (Fig. 2b). Sin embargo, perdieron la mayor parte de la reactividad frente a Vac/P después de la adsorción a células infectadas con este virus, pero retuvieron la reactividad con células HEp-2 infectadas con Vac/Fc (Fig. 2c). Finalmente, las tres preparaciones de anticuerpos se adsorbieron a células HEp-2 infectadas con Vac/Fc. En este caso, las tres preparaciones de anticuerpos adsorbidas perdieron la reactividad con células infectadas con Vac/P o Vac/Fc (Fig. 2d).

La unión a F_{TM^-} y la neutralización del VRSH se probaron con las tres preparaciones de anticuerpos de la Fig. 2 antes y después de las adsorciones descritas en el párrafo anterior. Mientras que la adsorción a células infectadas con Vac/P (Δ Vac) eliminó la reactividad de los tres anticuerpos con un extracto de células infectadas con Vac/P (no mostrado), no tuvo impacto sobre la unión a proteína a F_{TM^-} (Fig. 3a, b y c) o sobre la neutralización del VRSH (Fig. 3d, e y f). Por el contrario, la adsorción de los tres anticuerpos a células infectadas con Vac/Fc (Δ Fc) redujo la reactividad de $\alpha-Fc$ (Fig. 3a) y de $\alpha-Fc/F_{TM^-}$ (Fig. 3c) a valores de fondo mientras que la reactividad de $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ siguió siendo nula (Fig. 3b). El resultado más significativo fue que la capacidad neutralizante de las tres preparaciones de anticuerpos se eliminó tras la adsorción a células infectadas con Vac/Fc. En conclusión, la capacidad neutralizante de los anticuerpos $\alpha-Fc$ deplecionados de aquellos que se unen a F_{TM^-} ($\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$) se puede eliminar mediante la adsorción a células infectadas con Vac/Fc (Fig. 3e). Por tanto, se puede postular que los anticuerpos $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ reconocen una conformación de la proteína F del VRSH que ésta adopta cuando está insertada en membranas pero no cuando se expresa como una molécula soluble sin la región transmembranal.

Estabilización de la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH y reactividad con anticuerpos de conejo y humanos. Para apoyar la idea de que los anticuerpos $\alpha-Fc/\Delta F_{TM^-}$ se unen específicamente a la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH, se intentó purificar la proteína en la forma pre-fusión. Sin embargo, intentos anteriores de solubilizar la forma pre-fusión habían fracasado probablemente porque al estar en un estado metaestable se facilita el replegamiento a la forma post-fusión que es más estable. Por ello, la estabilización de la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH se intentó mediante la introducción de puentes disulfuro intermonoméricos que previniesen el replegamiento después de la solubilización. La secuencia aminoacídica de la proteína original, es decir, de la proteína F del VRSH sobre la que se realizaron las modificaciones aquí descritas era la SEQ ID NO: 1. Así, se diseñaron dos construcciones, una de ellas, denominada FcN, tenía los residuos básicos Arg106, Arg108, Arg109, Lys131, Lys132, Arg133, Lys134, Arg135 y Arg136 de los sitios de corte de furina reemplazados por Asn para evitar los cortes proteolíticos y además una cola de His (SEQ ID NO: 2) en su extremo C-terminal para facilitar su purificación en columnas de Ni(2+). En la otra construcción, denominada FcN/2C-C, además de estas modificaciones se diseñaron dos enlaces S-S adicionales tomando como base un modelo de la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH construido con las coordenadas atómicas de la proteína homóloga del virus de la parainfluenza tipo 5 (PIV5). Ambas construcciones se incorporaron a recombinantes del virus vaccinia para su producción a gran escala en cultivos celulares. Se debe resaltar que los puentes disulfuro intermonoméricos solo se podrían formar si la proteína está en la forma pre-fusión (Fig. 4a) pero no si se hubiese replegado a la forma post-fusión (Fig. 4b).

El análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras mostró, tras la tinción con azul de Coomassie, una banda de alto peso molecular (> 250 kDa) en la proteína FcN/2C-C compatible con un trímero de la proteína F- que estaba ausente en la proteína FcN (Fig. 4c). Bajo estas condiciones, el carril de la FcN tenía una banda de 80 kDa, que corresponde al monómero de la proteína F (F0) y una banda minoritaria de aproximadamente 190 kDa, probablemente un dímero de F debido a una desnaturalización incompleta. Estas dos bandas se vieron como componentes minoritarios de la proteína FcN/2C-C no reducida, indicando que la formación de los puentes disulfuro adicionales no fue 100% eficiente. La proteína F_{TM^-} tenía una sola banda que migraba algo más deprisa que la proteína F0, de acuerdo con su reducida masa molecular. La relación de todas estas bandas con la proteína F del VRSH se puso de manifiesto en un

“western blot” hecho con anticuerpos α -F_{TM}- (Fig. 4d). Las diferencias en las proporciones relativas de las bandas teñidas con azul de Coomassie y “western blot” probablemente reflejan la dificultad inherente de la electrotransferencia de proteínas de alto peso molecular.

5 La microscopía electrónica de la proteína FcN teñida negativamente mostró moléculas en forma de cono con un contorno y forma uniforme (Fig. 4f) que se asemejan a la estructura de la proteína F_{TM}- en la forma post-fusión (Fig. 4e). Por el contrario, las moléculas FcN/2C-C tenían una forma redondeada (Fig. 4g) similar a la forma pre-fusión publicada para la proteína F del PIV5.

10 Las preparaciones de anticuerpos de conejo descritas en apartados anteriores se probaron por ELISA para la unión a las proteínas F_{TM}-, FcN y FcN/2C-C. Los resultados de la Fig. 5a demuestran que los anticuerpos α -Fc y α -F_{TM}- se unieron de forma similar a las tres proteínas pero que los anticuerpos α -Fc/ Δ F_{TM}-, aunque fueron capaces de unirse a la proteína FcN/2C-C, no se unieron a las proteínas F_{TM}- y FcN. Esta conclusión se apoya aún más por la ausencia de unión de anticuerpos específicos frente al haz de 6-hélices -una estructura característica de la forma post-fusión- a la proteína FcN/2C-C, mientras que estos anticuerpos se unieron eficientemente a las proteínas F_{TM}- y FcN (Fig. 5a, panel \square -6-HB).

20 Se ha descrito anteriormente que anticuerpos presentes en una preparación de inmunoglobulinas (Ig) humana (Respigam) eran capaces de neutralizar la infectividad del VRSH, incluso si se habían deplecionado los anticuerpos que se unen a la proteína F_{TM}-. Para aclarar las especificidades de estos anticuerpos se probaron en un ELISA “sándwich” con las proteínas F_{TM}-, FcN y FcN/2C-C. Como se observa en la Fig. 5a (panel inferior izquierda), los anticuerpos RG se unieron a las tres proteínas, pero cuando se deplecionaron de aquellos que se unen a F_{TM}-Sepharsosa (RG/ Δ F_{TM}-, panel inferior derecha) no se unieron a F_{TM}- ni a FcN aunque todavía reaccionaron con la proteína FcN/2C-C, mimetizando la reactividad de los anticuerpos de conejo α -Fc/ Δ F_{TM}-. Además, los anticuerpos RG y RG/ Δ F_{TM}- neutralizaron eficientemente al VRSH incluso si estos anticuerpos se habían deplecionado de los anticuerpos α -G (RG/ Δ F_{TM}-/ Δ G), pero no si se deplecionaban además de los anticuerpos que se unen a células infectadas con Vac/Fc (Fig. 5b) o Vac/FcN/2C-C (no mostrado). Por tanto, una gran proporción de los anticuerpos RG neutralizantes, que se han producido presumiblemente tras infecciones naturales con VRSH, están dirigidos contra la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH presentes en la superficie celular y representada en la proteína FcN/2C-C.

30 A resaltar que, a pesar de las diferencias estructurales significativas entre FcN y FcN/2C-C (es decir, entre las formas pre- y post-fusión de la proteína F del VRSH, ver Fig. 4a y b), ambas proteínas se unen de forma similar a cuatro AcMs α -Fc específicos de epítopos distintos, incluyendo el palivizumab que se usa en la clínica (Fig. 5c). Por tanto, los repliegamientos estructurales que tienen lugar mientras que la proteína F del VRSH pasa de la forma pre-fusión a la forma post-fusión mantienen las estructuras locales de los epítopos reconocidos por varios AcMs.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

40 Virus. La cepa Long del VRSH se creció en células HEp-2 con medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con un 2,5% de suero fetal de ternera (DMEM2,5). Los recombinantes del virus vaccinia que expresan la fosfoproteína (Vac/P), la glicoproteína G (Vac/G) y la forma completa (Vac/Fc) o soluble (Vac/F_{TM}-) de la proteína F del VRSH se crecieron en células de mono CV-1. Nuevos recombinantes del virus vaccinia se obtuvieron por el método de Blasco y Moss (Blasco, R. & Moss, B., 1995, *Gene*, 158: 157-162), y expresan la proteína F del VRSH en la que los residuos básicos de los dos sitios de corte de furina se han sustituido por Asn (Vac/FcN) o que, además de esta modificación, tienen los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 sustituidos por Cys (Vac/FcN/2C-C). Ambas, FcN y FcN/2C-C se modificaron para añadir una cola de His (SEQ ID NO: 2) al extremo C-terminal con el fin de facilitar la purificación en columnas de (Ni²⁺).

50 Expresión y purificación de proteínas. La forma soluble de la proteína F del VRSH se purificó a partir del sobrenadante de células Hep-2 infectadas con Vac/F_{TM}-. Una parte de esta proteína se unió covalentemente a bolitas de Sepharsa activadas con CNBr para hacer columnas de F_{TM}-Sepharsa. FcN y FcN/2C-C se extrajeron de células infectadas con los recombinantes correspondientes del virus vaccinia en un buffer que tenía: 50 mM fosfato sódico, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol y 1% octil-glucósido. Los extractos se cargaron en columnas de “His-Select Nickel” (Sigma) y se lavaron con este mismo buffer pero con 20 mM imidazol. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron aumentando la concentración de imidazol a 250 mM.

60 Inmunizaciones de conejos, purificación de anticuerpos y depleción de anticuerpos específicos de conformación. Conejos “New Zealand” se inocularon intramuscularmente (i.m.) los días 0 y 21 con 10⁶ partículas infectivas de Vac/Fc o Vac/F_{TM}-. Los sueros se recogieron una semana más tarde y los anticuerpos totales se purificaron en columnas de proteína A-Sepharsa siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences).

La depleción de anticuerpos α -F_{TM}- se hizo aplicando los anticuerpos totales a una columna de F_{TM}-Sepharsa. El material no retenido que contenía los anticuerpos deplecionados se recogió y guardó y los anticuerpos retenidos en la columna se eluyeron con 0,1 M Glicina-HCl, pH 2,5 y se neutralizaron con Tris saturado.

65

5

La depleción de anticuerpos específicos se realizó también incubando 2 mg de anticuerpos totales durante 30 minutos a 37°C con 10^7 células HEp-2 infectadas 24 horas antes, a una multiplicidad de 5 unidades infectivas/célula, con los recombinantes del virus vaccinia que se especifican en las leyendas de las figuras. Después de esta incubación, las células se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad y los sobrenadantes se recogieron y se guardaron hasta su uso.

10

La depleción de los anticuerpos presentes en la preparación de inmunoglobulinas humanas Respigam™ se hizo de forma análoga a la empleada para los anticuerpos de conejo.

Inmunoensayos. Los ELISAs se hicieron en placas de 96 pocillos recubiertas con los antígenos indicados en las figuras, bien mediante adsorción al plástico o mediante captura con anticuerpos específicos. El "western blot" se hizo después de separar las proteínas mediante SDS-PAGE, revelándolo con los anticuerpos indicados en las figuras.

15

Los ensayos de microneutralización se realizaron en placas de 96 pocillos con células HEp-2 confluentes al 90%. La cepa Long del VRSH se usó para infectar las monocapas (1-2 unidades infecciosas/célula) bien en presencia o ausencia de anticuerpos. Después de 72 horas, se eliminó el medio y después de lavarse las células con 0,05% Tween-20 en PBS, éstas se fijaron con acetona fría al 80% en PBS. La cantidad de antígeno viral en cada pocillo se cuantificó por ELISA usando una mezcla de AcMs específicos para las proteínas F y G. La neutralización en este caso se refiere a la reducción de antígeno viral producido, normalizada para un cultivo control sin anticuerpo.

20

La citometría de células infectadas con los virus indicados en las figuras se hizo mediante procedimientos estándar, después de despegar las células de las placas con 10 mM EDTA.

25

Microscopía electrónica. 2-5 µl de cada proteína purificada se aplicó a rejillas recubiertas de carbón "glow-discharged" y se tiñeron negativamente con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%. Las micrografías se tomaron con un microscopio Tenai 12 FEI operado a 120 kV y una ampliación nominal de 67.000 X.

REIVINDICACIONES

1. Proteína F del VRSH en conformación pre-fusión que presenta al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 1, que comprende:
 - a. al menos un puente disulfuro intermonomérico en la región que comprende los aminoácidos 450 a 550 de su secuencia aminoacídica, y
 - b. al menos dos aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 106 a 109 de su secuencia aminoacídica y al menos cuatro aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 131 a 136 de su secuencia aminoacídica, sustituidos por asparagina o por glutamina.
2. Proteína según la reivindicación 1 que comprende dos puentes disulfuro intermonoméricos formados mediante la sustitución de los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 por cisteínas.
3. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende los aminoácidos básicos Arg106, Arg108, Arg109, Lys131, Lys132, Arg133, Lys134, Arg135 y Arg136 sustituidos por asparagina.
4. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende una cola de histidinas en el extremo C-terminal.
5. Proteína según la reivindicación 4 donde la cola de histidinas se ha formado mediante la adición de la SEQ ID NO: 2 en el extremo C-terminal de la proteína.
6. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.
7. Secuencia nucleotídica aislada que codifica para la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Anticuerpo frente a la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Aptámero frente a la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Método de obtención de la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende:
 - a. sustituir, en una secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH que presenta al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 1, al menos dos aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 106 a 109 y al menos cuatro aminoácidos básicos del punto de corte de furina que comprende los aminoácidos 131 a 136, por asparagina o por glutamina,
 - b. introducir al menos un puente disulfuro intermonomérico en la región que comprende los aminoácidos 450 a 550 de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (a),
 - c. expresar la proteína F del VRSH modificada en los pasos (a) y (b) en un sistema de expresión, y
 - d. purificar la proteína expresada en el paso (c).
11. Método según la reivindicación 10, donde los aminoácidos básicos del paso (a) son Arg106, Arg108, Arg109, Lys131, Lys132, Arg133, Lys134, Arg135 y Arg136 y se sustituyen por asparagina.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde en el paso (b) se introducen dos puentes disulfuro intermonoméricos mediante la sustitución de los aminoácidos Leu481, Asp489, Ser509 y Asp510 de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (a) por cisteínas.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que además comprende añadir una cola de histidinas en el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (b).
14. Método según la reivindicación 13, donde la cola de histidinas se añade mediante la adición de la SEQ ID NO: 2 en el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica de la proteína F del VRSH del paso (b).
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 donde el sistema de expresión del paso (c) es el virus vaccinia.
16. Uso de la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la identificación o diseño de compuestos o composiciones para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infecciones producidas por virus pertenecientes al género *Pneumovirus*.
17. Uso de la proteína según la reivindicación 16 donde el virus es el VRSH.
18. Uso de la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento.

- 5
- 10
- 15
- 20
19. Uso de la proteína según la reivindicación 18 para la elaboración de un medicamento para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infecciones producidas por virus pertenecientes al género *Pneumovirus*.
 20. Uso de la proteína según la reivindicación 19 donde el virus es el VRSH.
 21. Uso de la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 donde el medicamento es una vacuna.
 22. Uso del anticuerpo según la reivindicación 8 o del aptámero según la reivindicación 9 para la detección de la proteína F de virus pertenecientes al género *Pneumovirus*.
 23. Uso del anticuerpo o del aptámero según la reivindicación 22 donde el virus es el VRSH.
 24. Uso del anticuerpo según la reivindicación 8 o del aptámero según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento.
 25. Uso del anticuerpo o del aptámero según la reivindicación 24 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de infecciones producidas por virus pertenecientes al género *Pneumovirus*.
 26. Uso del anticuerpo o del aptámero según la reivindicación 25 donde el virus es el VRSH.

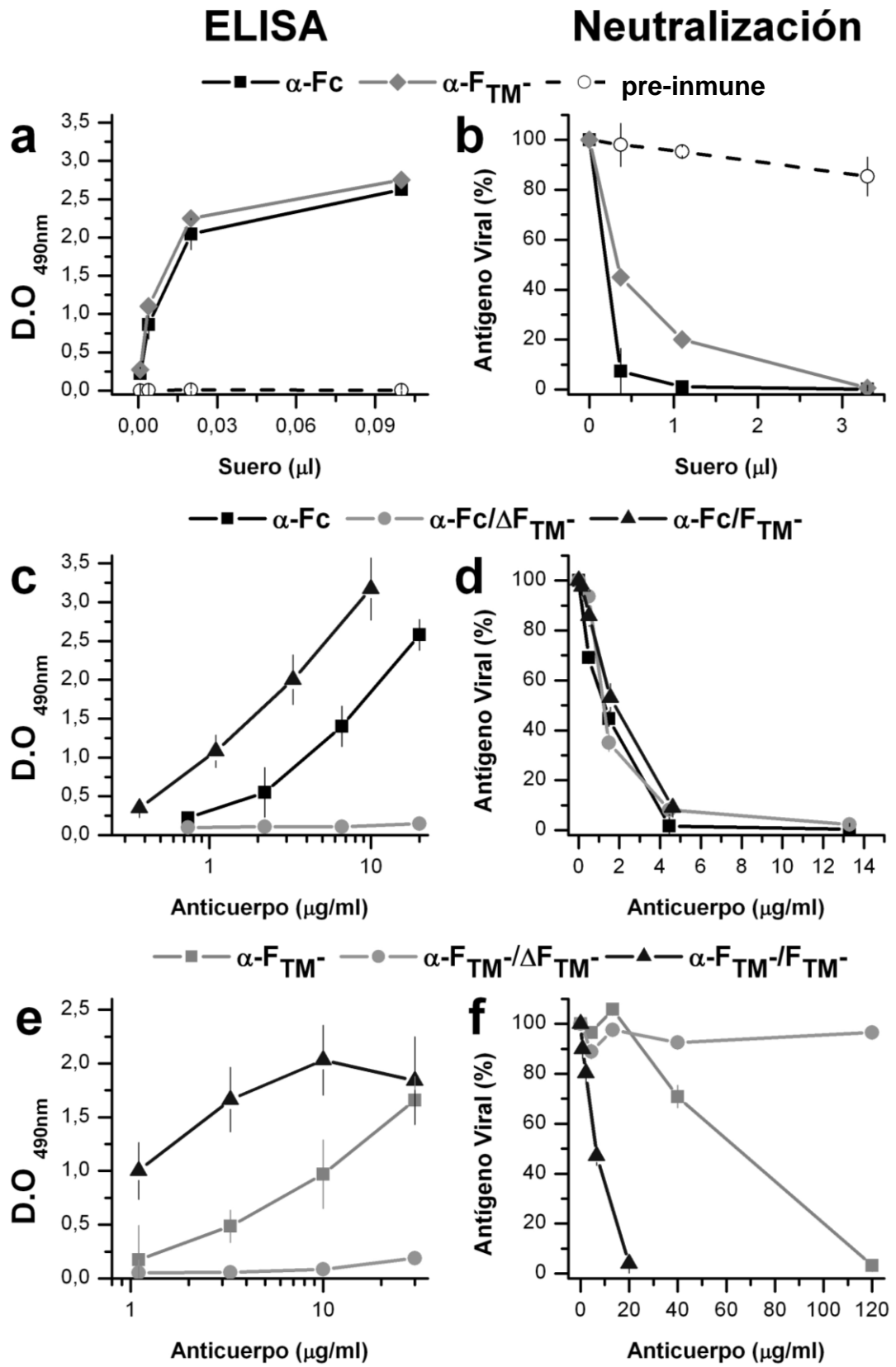


FIG. 1

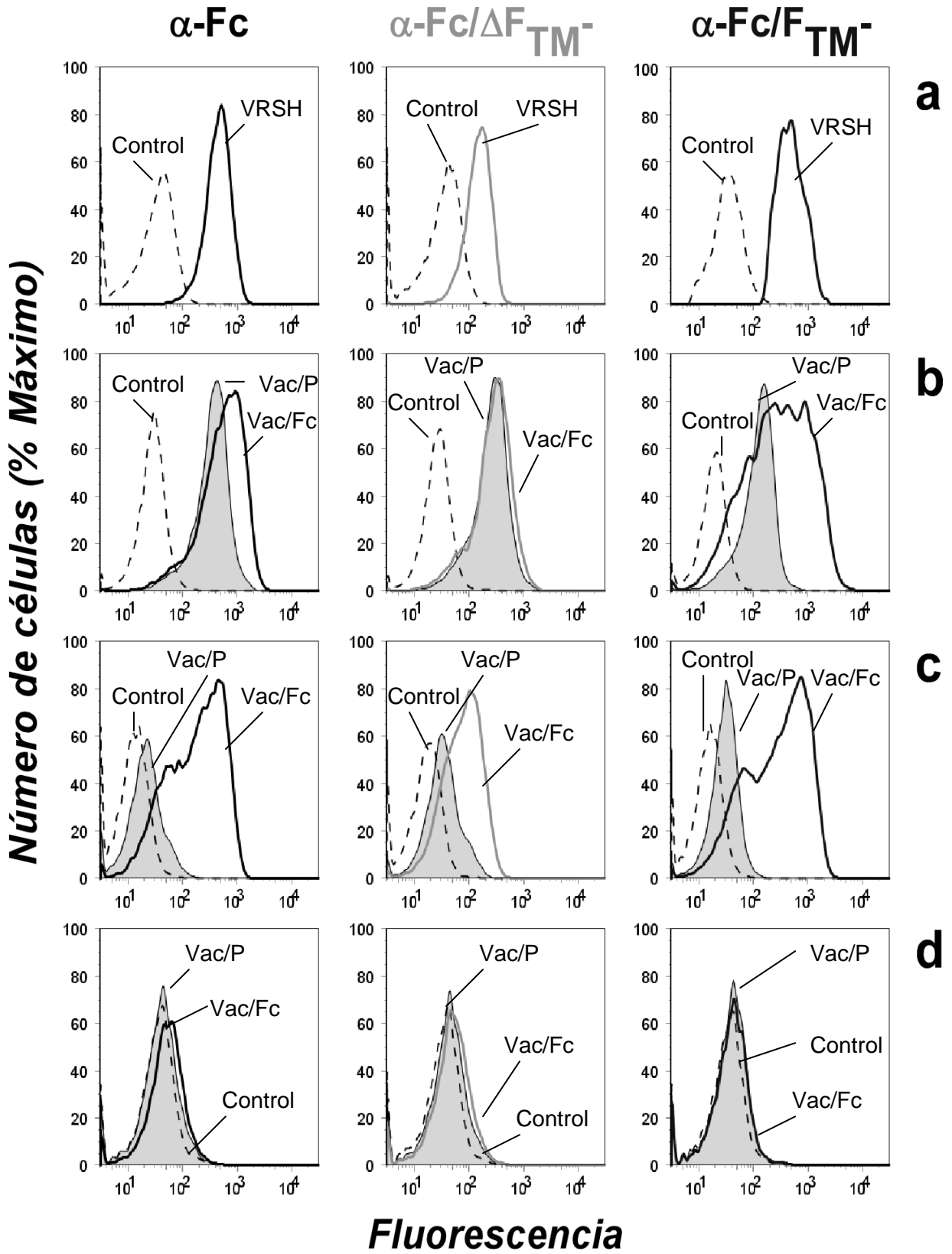


FIG. 2

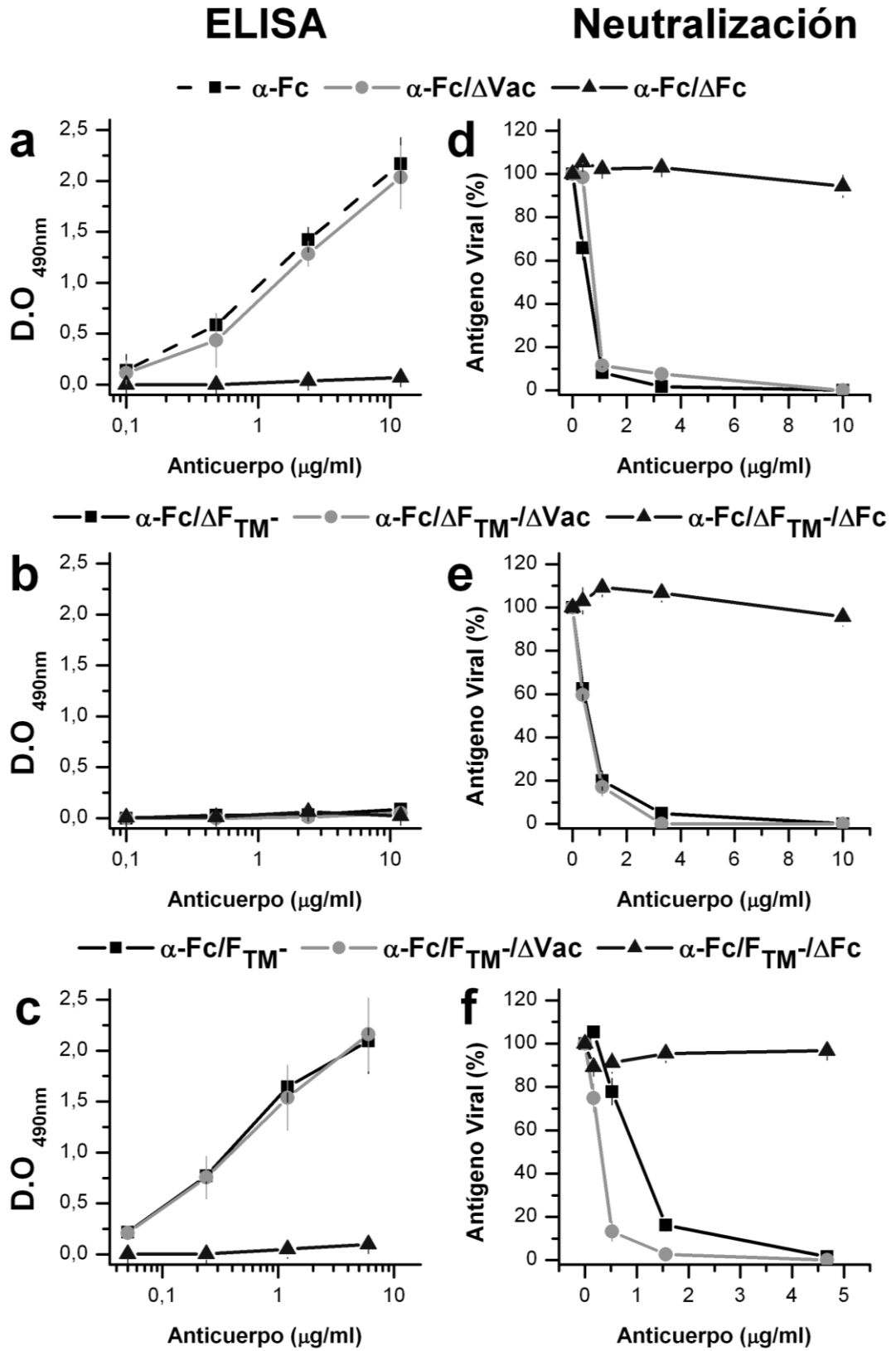


FIG. 3

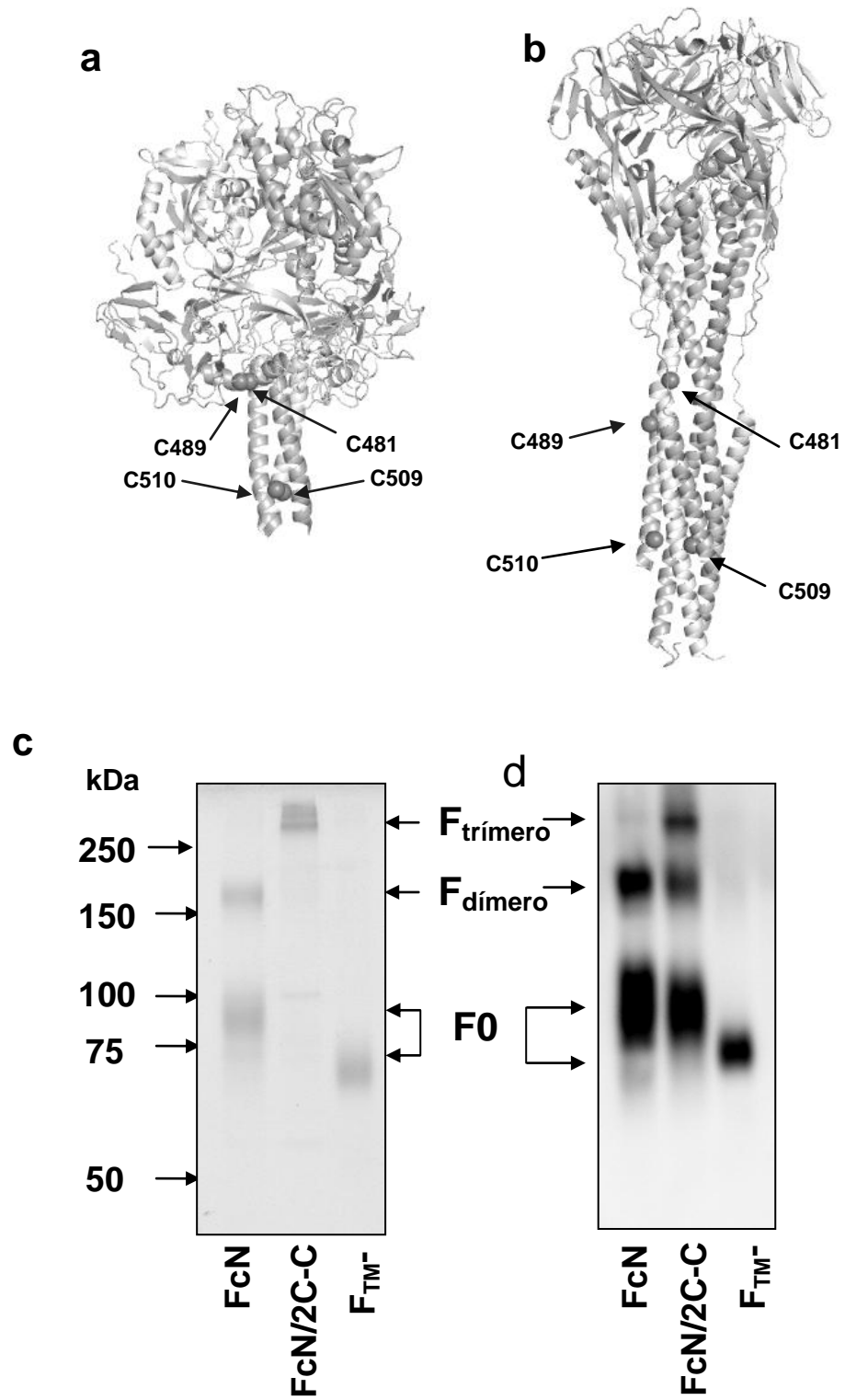


FIG. 4

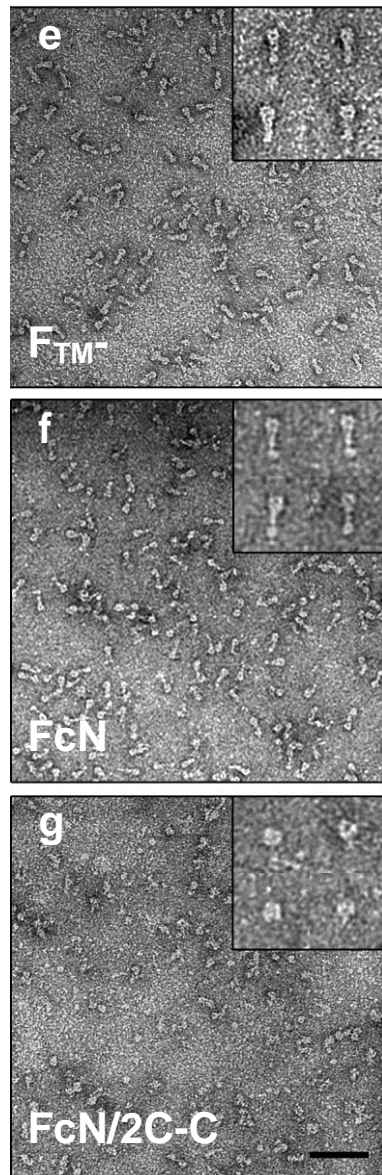


FIG. 4 (cont.)

a ELISA Sandwich

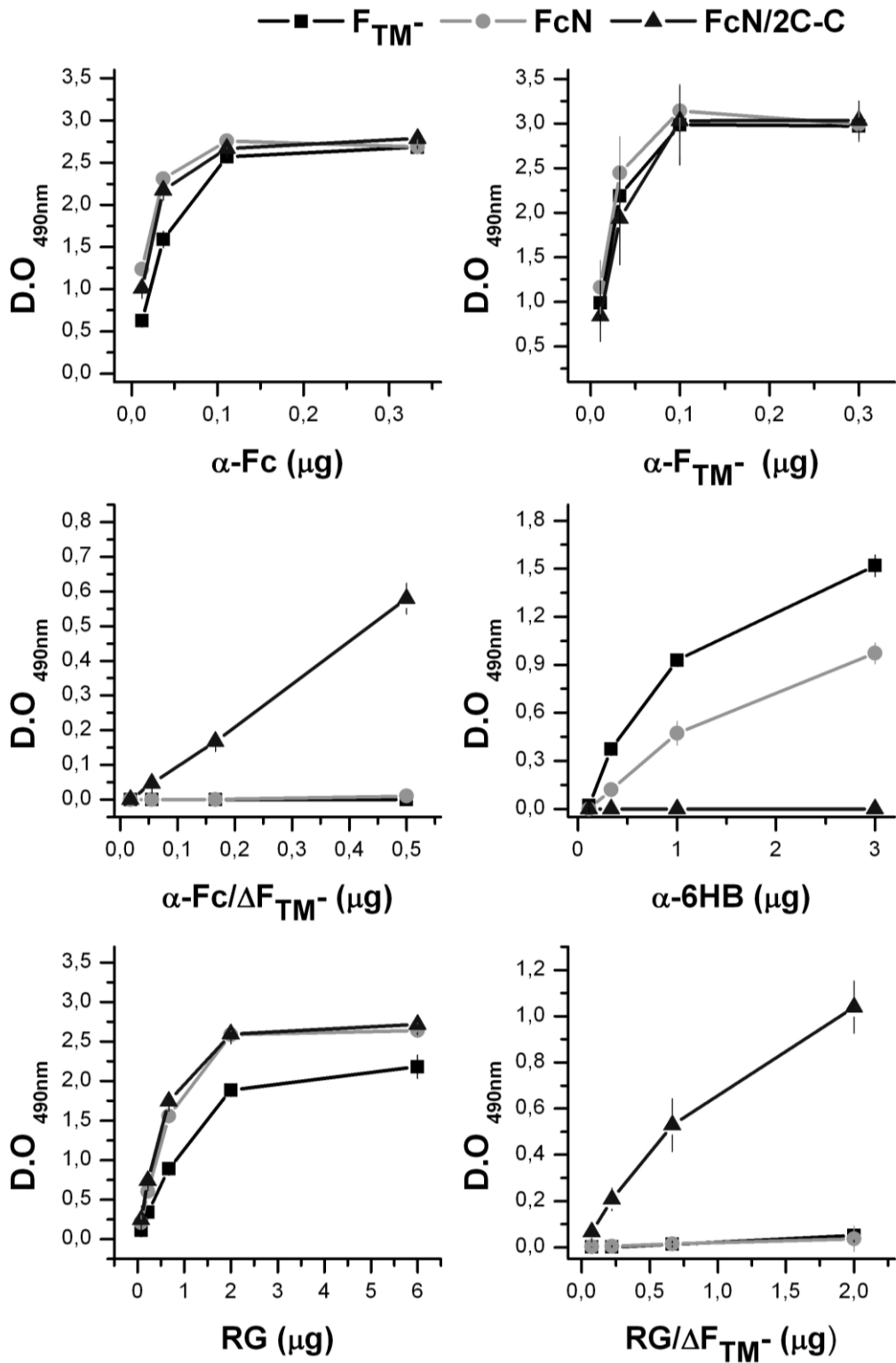
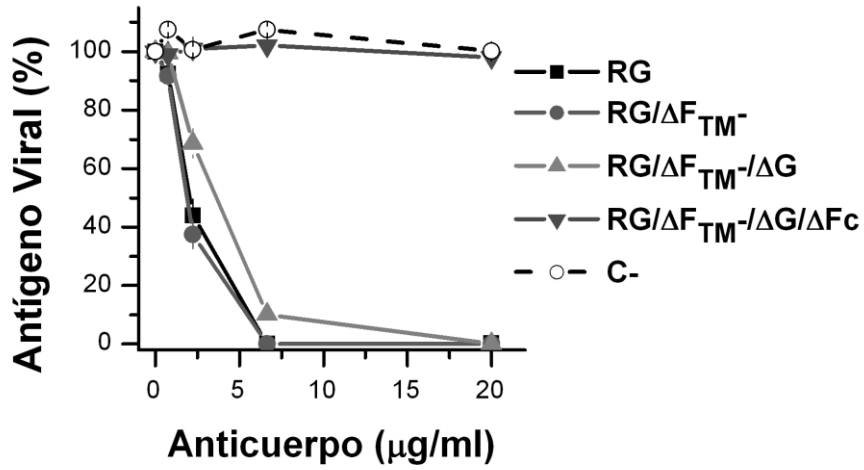


FIG. 5

b Neutralización



c ELISA

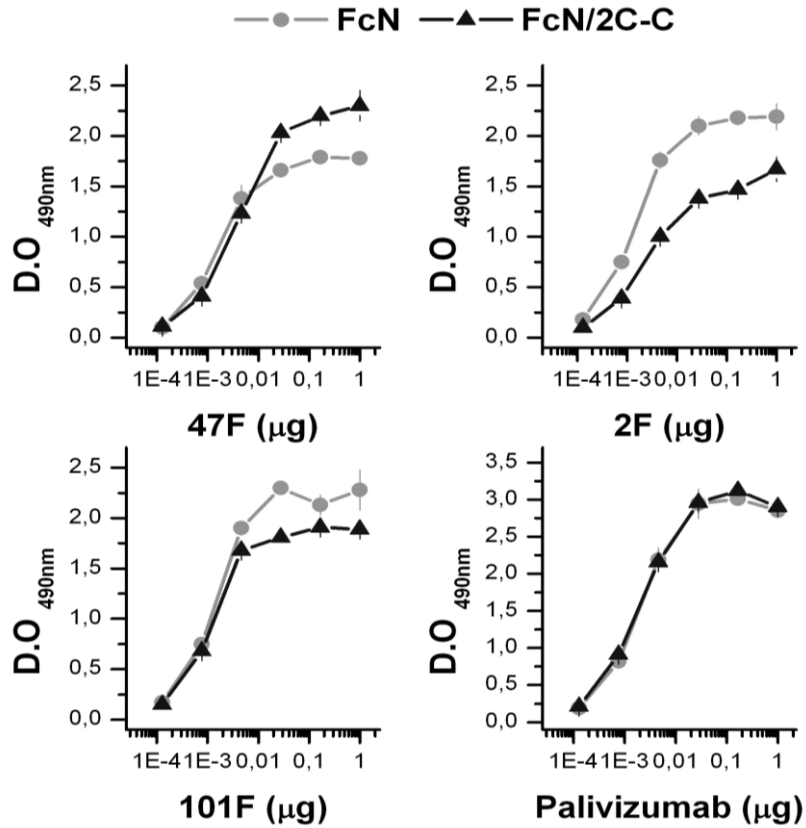


FIG. 5 (cont.)



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131316

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 8902935 A1 (PRAXIS BIOLOGICS, INC. [US/US]) 06.04.1989, página 12, línea 1 – página 13, línea 17; página 15, líneas 6-27; página 16, líneas 7-18; reivindicaciones 1,8-10,17.	1-26
A	GONZALEZ-REYES L. et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. PNAS. 2001, Vol. 98(17), páginas: 9859-9864, todo el documento.	1-26
A	CHAIWATPONGSAKORN S. et al. Soluble Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein in the Fully Cleaved, Pretriggered State Is Triggered by Exposure to Low-Molarity Buffer. Journal of Virology. Abril 2011, Vol. 85, páginas: 3968-3977, resumen.	1-26
A	ES 2314102 T3 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 16.03.2009, página 2, línea 64 – página 3, línea 31; página 9, línea 37 – página 10, línea 54; reivindicaciones 1,15-16.	1-26
A	WO 2008114149 A2 (ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC [CA/CA]) 25.09.2008, página 2, línea 64 – página 3, línea 31; página 9, línea 37 – página 10, línea 54; reivindicaciones 1,15-16.	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
19.11.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/62 (2006.01)

C07K14/135 (2006.01)

C07K16/10 (2006.01)

A61K39/155 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 8902935 A1 (PRAXIS BIOLOGICS, INC. [US/US])	06.04.1989
D02	GONZALEZ-REYES L. et al. PNAS. 2001, Vol. 98(17), páginas: 9859-9864.	2001
D03	CHAIWATPONGSAKORN S. et al. Journal of Virology. Abril 2011, Vol. 85, páginas: 3968-3977.	Abril 2011
D04	ES 2314102 T3	16.03.2009
D05	WO 2008114149 A2	25.09.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga una proteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial humano (VRSH), en conformación pre-fusión estabilizada (reivindicaciones 1-9). Se refiere también a un procedimiento para la obtención de dicha proteína (reivindicaciones 10-15) y a su uso para identificar anticuerpos específicos para diagnóstico, prevención y tratamiento de infecciones producidas por *Pneumovirus* (reivindicaciones 16-26).

El documento D01 divulga las propiedades de protección de la proteína F del virus respiratorio sincitial, completa o en forma monomérica desglucosilada. Se refiere a polipéptidos y proteínas relacionados con epítomos neutralizantes de la proteína F, así como a su uso como inmunógenos en formulaciones de vacunas para diagnóstico y prevención de infecciones provocadas por dicho virus (ver página 12, línea 1 - página 13, línea 17; página 15, líneas 6 - 27; página 16, líneas 7-18; reivindicaciones 1, 8-10, 17).

El documento D02 divulga un estudio sobre la activación de la membrana de fusión del virus respiratorio sincitial humano (VRSH) y el requerimiento de corte en dos lugares específicos para activación de la fusión de las membranas del virus con la célula (ver todo el documento).

El documento D03 divulga la obtención de la proteína F del VRSH, en conformación pre-fusión en estado soluble, mediante la sustitución de las secuencias de aminoácidos de los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína F por una cola de 6His, modulando la molaridad del buffer empleado para la elución durante el proceso de purificación (ver resumen).

El documento D04 divulga un péptido inmunógeno derivado de la proteína G del virus respiratorio sincitial y su uso para preparación de composiciones farmacéuticas para prevención y tratamiento de infecciones provocadas por dicho virus (ver página 2, línea 64 - página 3, línea 31; página 9, línea 37 - página 10, línea 54; reivindicaciones 1, 15-16).

El documento D05 divulga polipéptidos quiméricos que incluyen en la región N-terminal, o C-terminal, un primer dominio de la proteína F, un dominio de la proteína G y un segundo dominio de la proteína F, así como su uso para preparación de composiciones inmunogénicas para prevención y tratamiento de infecciones causadas por el virus respiratorio sincitial (ver párrafos 62 -64; reivindicaciones 1-5).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente invención divulga una proteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial humano (VRSH), en conformación pre-fusión estabilizada; así como un procedimiento para la obtención de dicha proteína y su uso para diagnóstico, prevención y tratamiento de infecciones producidas por *Pneumovirus*.

1.1. REIVINDICACIONES 1-26

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa polipéptidos y proteínas relacionados con epítomos neutralizantes de la proteína F, así como a su uso como inmunógenos en formulaciones de vacunas para diagnóstico y prevención de infecciones provocadas por dicho virus.

La diferencia entre el documento D01 y la presente invención radica en la secuencia de aminoácidos que forma la proteína reivindicada en la presente invención. La obtención de mutantes de la proteína F del VRSH es anticipada en el documento D02, así como la sustitución de los aminoácidos *Arg108N*, *Arg109N* y *Lys131Q*. Por otra parte, el documento D03 anticipa obtención de la proteína F del VRSH, en conformación pre-fusión en estado soluble, mediante la sustitución de las secuencias de aminoácidos de los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína F por una cola de 6His.

Aunque a la vista de los documentos D01-D02 la obtención de una proteína F del VRSH, en conformación pre-fusión, podría resultar evidente, de acuerdo a la información disponible para el experto en la materia, sin embargo, al tratarse de unas modificaciones específicas en la secuencia de aminoácidos que forma esta proteína, se considera que la invención proporciona una proteína nueva, para identificar anticuerpos específicos para diagnóstico, prevención y tratamiento de infecciones producidas por *Pneumovirus*, alternativa a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en D01-D03, las reivindicaciones 1-26 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D04 - D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.