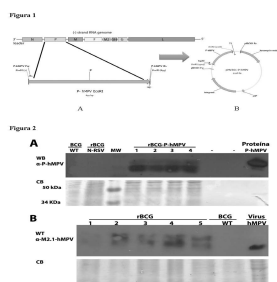


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1

Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

FORMULACION INMUNOGENICA QUE CONTIENE BCG VIVAS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTIGENOS DE METAPNEUMOVIRUS (hMPV), EN UNA SUSPENSION QUE SE PREPARA A PARTIR DE UN LIOFILIZADO SIN LA NECESIDAD DE ADYUVANTE, APTA PARA SU USO FARMACEUTICO

2

Datos del Solicitante

Nombre:

PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
CHILE

**Dirección
Electrónica:**

notificaciones@clarkemodet.com.co

Dirección:

Avenida Libertador
Bernardo
O'Higgins 340,

**Domicilio/País de
constitución:**

CHILE - SANTIAGO - SANTIAGO
DE CHILE

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

4097407-

3

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CHILE NN 4097407

4

Datos del Inventor

Nombre:

Susan Marcela
BUENO
RAMIREZ,

Dirección Electrónica:

notificaciones@clarkemodet.com.co

Dirección:

Avenida
Libertador
Bernardo
O'Higgins 340,

Domicilio/País de constitución:

CHILE - SANTIAGO - SANTIAGO
DE CHILE

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT
☐ PASAPORTE ☒ No Aplica

Número:

-

5

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

1. BUENO RAMIREZ, Susan Marcela CHILE
2. KALERGIS PARRA, Alexis Mikes CHILE
3. PALAVECINO BEAUMONT, Christian CHILE

6

Datos Inventor(es)

País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. CHILE	SANTIAGO	SANTIAGO DE CHILE	Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340,
2. CHILE	SANTIAGO	SANTIAGO DE CHILE	Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340,
3. CHILE	SANTIAGO	SANTIAGO DE CHILE	Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340,

7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:	CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	CARRERA 11 NO. 86-53, PISO 6	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 66783790-			

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:	PCT/IB2014/064963	Fecha Solicitud:	30/09/2014
Número Publicacion:	WO 2015/049633	Fecha Publicacion:	09/04/2015

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO
---	----------------------------	--

1.	(33) País de origen CHILE	Codigo del país CL	(31) No. Solicitud CL2013-02829	(32) Fecha 01/10/2013
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		14	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

Figura 1

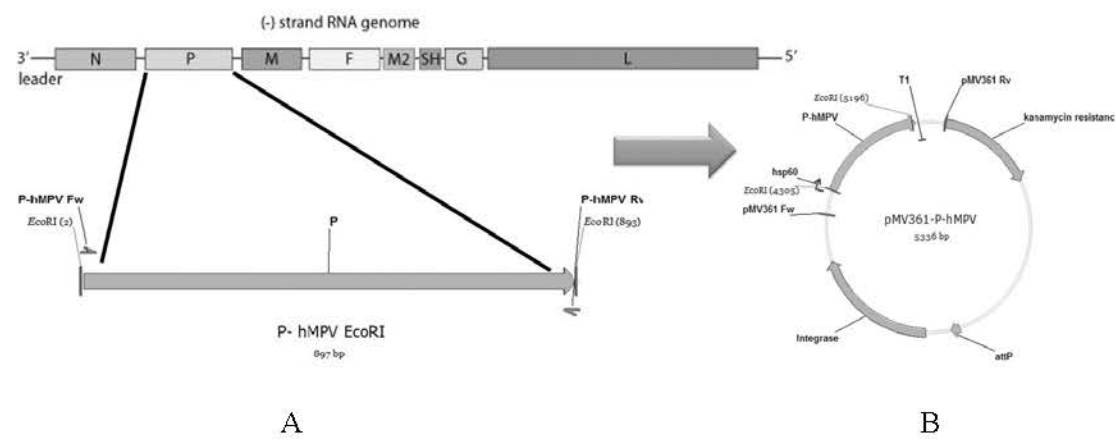
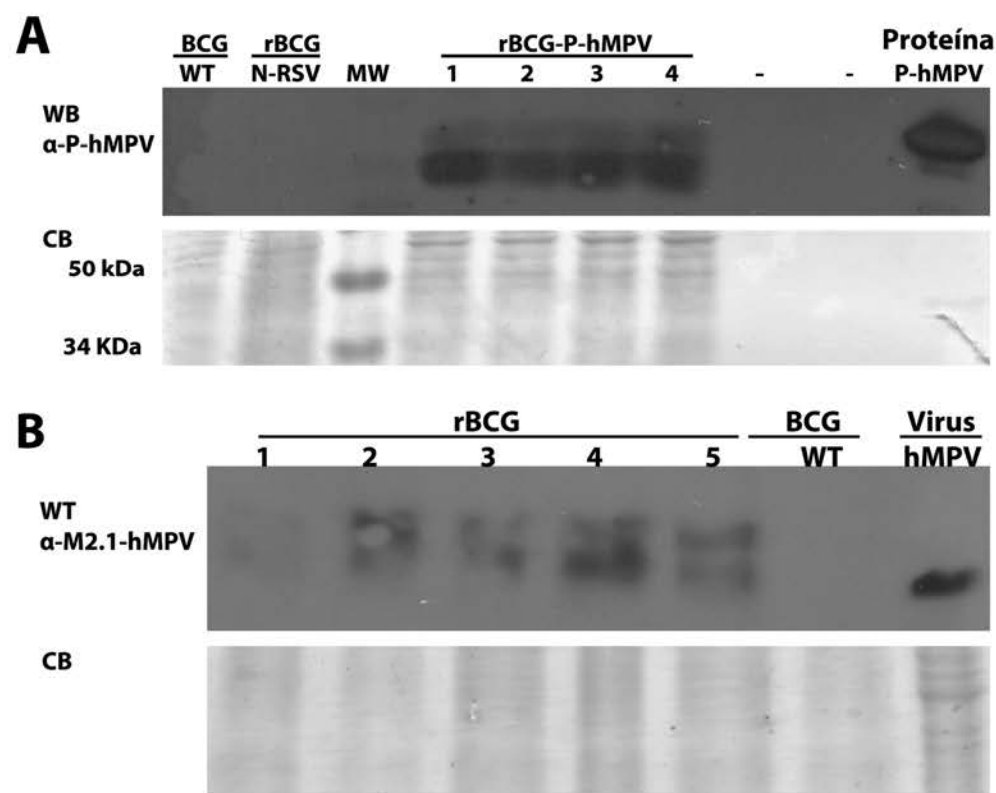


Figura 2



FORMULACION INMUNOGENICA QUE CONTIENE BCG VIVAS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTIGENOS DE METAPNEUMOVIRUS (hMPV), EN UNA SUSPENSION QUE SE PREPARA A PARTIR DE UN LIOFILIZADO SIN LA NECESIDAD DE ADJUVANTE, APTA PARA SU USO FARMACEUTICO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con las áreas de inmunología y biotecnología, abordando específicamente una formulación inmunogénica basada en una bacteria atenuada recombinante a ser utilizada en la preparación de una vacuna contra Metapneumovirus humano (hMPV). Dicha formulación contiene el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) recombinante, que expresa el péptido antigénico proteína P del virus hMPV.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El Metapneumovirus humano (de ahora en adelante hMPV), es el agente etiológico de un alto porcentaje de las hospitalizaciones y la morbilidad asociadas a enfermedades respiratorias agudas de los tractos respiratorio superior e inferior, especialmente en infantes, personas de la tercera edad e individuos inmunocomprometidos. La infección por este virus se asocia a una amplia gama de patologías, dentro de las cuales la bronquiolitis y neumonía corresponden a los cuadros con mayor impacto socio-económico. Adicionalmente, han sido asociadas con gastroenteritis, y queratoconjuntivitis. Calvo y colaboradores (2008) demostraron en un período de 3 años que la incidencia acumulada de infecciones respiratorias agudas los virus respiratorios VRS, ADV y hMPV, son responsables del 64,5% de las hospitalizaciones de niños menores de 2 años, siendo la incidencia para cada uno de los virus de 35,4%, 19,3% y 9,8% respectivamente. Una característica interesante que hMPV comparte con los otros virus respiratorios de alta incidencia es la producción de infecciones repetidas a lo largo de la infancia, fenómeno posiblemente asociado a una falla en el establecimiento de una respuesta inmune protectora frente a la primera infección durante los primeros meses de vida. Este último fenómeno motiva la urgente necesidad en los sistemas públicos de salud por nuevos prototipos de vacunas capaces de controlar brotes anuales de infecciones respiratorias, de tal modo que permita disminuir la congestión de los centros asistenciales y en último término, el

- impacto socio-económico asociado a estas infecciones. No hay estudios hasta el momento del impacto económico específico que ocasiona la infección por hMPV, sin embargo, la incidencia de hospitalización por hMPV se ha estimado en 1/3 respecto de la incidencia de hospitalización por virus respiratorio sincicial humano (hRSV). Estudios realizados en países desarrollados, estiman que el costo individual de la infección por hRSV es de sobre 3.000 euros (\$1.860.000 pesos chilenos) con un límite superior de hasta 8.400 euros (\$5.200.000 pesos chilenos). Los costos por concepto de hospitalización individual se sugieren aproximados, considerando que el proceso patológico que amerita la hospitalización es de similares características.
- 10 El virus hMPV se clasifica en la familia *Paramyxoviridae* subfamilia *Pneumovirinae*, la misma en que se clasifica hRSV, si bien cada uno está agrupado dentro de los géneros *Metapneumovirus* y *Pneumovirus*, respectivamente. El genoma de hMPV está compuesto por ácido ribonucleico de hebra simple (ssRNA) no segmentada de sentido negativo, por lo que las proteínas virales se organizan en sentido 3' a 5' (con respecto a su secuencia) de la siguiente forma: N, P, M, F, M2 (ORF1 y 2), SH, G y L. Cinco de estas proteínas son responsables del empaquetamiento del material genético y de definir la estructura propia de la partícula viral, correspondiendo a la proteína de nucleocápside N y la proteína de matriz M, junto a las glicoproteínas de transmembrana F, G y SH, respectivamente. Las otras cuatro proteínas, M2-1, M2-2, P y L, están involucradas en la replicación y transcripción viral.
- 15 Existen 2 subtipos de hMPV, clasificados como A y B respecto de dos grupos antigénicos basados en diferencias de secuencia principalmente en las proteínas F y G. Si bien estas proteínas presentan cierto grado de diferencia, existe una alta identidad respecto de las otras proteínas codificadas por el genoma viral.

El desarrollo de vacunas contra virus respiratorios se inició en la década de 1960 con el primer prototipo de vacuna contra hRSV, basado en virus inactivado por formalina (hRSV-FI), que presentó importantes efectos adversos que impidieron utilización en programas de inmunización. La formulación intramuscular acompañada del adyuvante hidróxido de aluminio produjo en los infantes vacunados un cuadro más severo que en aquellos individuos que se infectaron que no fueron vacunados. Este efecto fue asociado con una hiper-reactividad de la respuesta inmune frente a la infección, caracterizándose por una elevada infiltración

parenquimatosa de polimorfonucleares, eosinófilos y neutrófilos además de un elevado título de anticuerpos fijadores de complemento.

Contra Metapneumovirus humano (hMPV) se han desarrollado pocas vacunas y hasta el momento ninguna ha tenido un resultado satisfactorio. Un prototipo que utilizó el mismo
5 diseño anterior de virus inactivado por formalina (hMPV-FI), también demostró producir cuadros de hiper-reactividad inflamatoria de similares características al producido por la vacuna contra hRSV en el modelo *Sigmodon hispidus* de infección (Yim *et al.*, 2007). A diferencia de los procesos de hiper-reactividad observados para hVRS, se demostró eliminación parcial del virus desde el sistema respiratorio. La enfermedad observada en
10 ratones y *Sigmodon hispidus* expuestos a hVRS-FI se asoció a una respuesta inmune patológica basada en anticuerpos de tipo Th2 y una activación exagerada de NF-κB. El incremento en la actividad transcripcional NF-κB se relaciona adicionalmente con la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-8. Por otro lado, la hiper-reactividad del tejido pulmonar luego de la infección por hMPV ha sido asociada a respuestas inmunes
15 caracterizadas por la presencia de IFN-γ e IL-4 en lavado bronco-alveolar y la detección de anticuerpos neutralizantes de los isotipos IgG1 e IgG2a en suero de ratones enfermos, sugiriendo fuertemente que la inflamación crónica observada se debe a respuestas patológicas de los tipos Th1 y Th2, o bien, a una insuficiente respuesta basada en células de tipo Th1 que se ve acompañada de una respuesta patológica Th2. En cuanto a este último postulado,
20 algunos autores han propuesto que una respuesta incrementada del tipo Th1, también podría exacerbar la enfermedad.

Estos antecedentes destacan la importancia de establecer una respuesta inmune equilibrada y eficaz, capaz de limitar el progreso del proceso inflamatorio y a la vez, inducir una adecuada eliminación de estos virus desde los tejidos infectados.

25 Debido a que la enfermedad respiratoria causada por hMPV es similar a lo visto anteriormente con hVRS, que se ha asociado con una falla en la inducción de inmunidad celular, es necesario generar un prototipo de vacuna cumpla con ser un buen inductor de células T CD8⁺ citotóxicas y células T CD4⁺ helper, ambos productores de IFN-γ. Las aproximaciones experimentales recientes han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de
30 vacunas contra sólo una especie viral, mediante el uso de distintas técnicas de genética molecular e inmunología. Es importante mencionar que estos estudios han utilizado una

cantidad limitada de proteínas o subunidades proteicas como antígenos para cada virus de interés. Para hVRS, algunas de ellas se han basado en el uso de proteínas virales individuales, como subunidades completas o fragmentos, de las proteínas F o G, o una mezcla de ellas en modelos de infección murino y primates no humanos. Se han utilizado en ensayos clínicos de fase I y II algunos prototipos de vacuna contra hVRS, pero los resultados no han demostrado una capacidad protectora a largo plazo, y las vacunas distan de ser adecuadas para su uso masivo en la profilaxis de la infección (Denis *et al.*, 2005; Karron *et al.*, 2005).

Mediante la eliminación de genes que se ha sugerido se relacionan con la patogenicidad viral se han desarrollado cepas de hMPV atenuadas. Cepas de hMPV carentes de los genes que codifican para las proteínas SH, G, M2-1 y M2-2 se han planteado como candidatos para vacunas (Biacchesi *et al.*, 2005). Estos candidatos han presentado buenos resultados en modelos animales pero aún no se han realizado estudios en seres humanos. Si bien, esta alternativa es viable, resulta ser costosa ya que requiere de la producción de virus en cultivos celulares que estén aprobados para uso en seres humanos. Otra fuente de vacuna es la sobreexpresión de proteínas virales por sistemas heterólogos, como la proteína F de hMPV, acoplada a adyuvantes genera anticuerpos neutralizantes, pero la desventaja de esta opción es que proporcionan inmunidad por un periodo muy corto de tiempo (Herfst *et al.*, 2008a).

No existen estudios clínicos para candidatos de vacunas contra hMPV, pues no se ha podido desarrollar prototipos capaces de generar inmunidad protectora. Los prototipos hasta ahora evaluados en modelos animales generan una inmunidad basada en anticuerpos de tipo Th2, que no son de largo plazo ni eficientes previniendo la infección. Animales vacunados con estos prototipos, si bien generan anticuerpos neutralizantes *in vitro*, no son protegidos contra la infección ni tampoco disminuyen los síntomas clínicos de la enfermedad inducida por la infección de hMPV en ratones (Cseke *et al.*, 2007) o en macacos (Herfst *et al.*, 2008b). La inmunidad basada en anticuerpos tampoco es eficiente neutralizando el virus *in vivo*. Anticuerpos capaces de neutralizar el hMPV *in vitro*, no son capaces de prevenir la infección ni la enfermedad ocasionada por hMPV, cuando se utilizan como terapias mediante inmunización pasiva (Hamelin *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha observado que la resolución del cuadro viral requiere de la participación de una respuesta inmune basada en células, de tipo Th1. Se demostró que la resolución del cuadro viral y la remoción de partículas virales es dependiente de la activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, si bien la actividad de estos es

responsable también de la inmunopatología de la enfermedad (Kolli *et al.*, 2008). Más recientemente se ha visto que los principales efectores en la resolución del cuadro viral son células citotóxicas de tipo CD8⁺, si bien los linfocitos T helper CD4⁺ tienen una participación regulatoria. Por esto, es necesaria una respuesta inmune equilibrada de tipo celular Th1 para producir la resolución del cuadro viral sin generar hiper-reactividad inflamatoria. En resumen, no existe en la actualidad una vacuna contra el Metapneumovirus humano (hMPV) que otorgue una protección efectiva y que no tenga efectos secundarios importantes, de hecho no existen vacunas comerciales disponibles contra este virus.

Sorprendentemente los inventores han encontrado que el uso de una cepa de *Mycobacterium* recombinante que expresa la proteína P del Metapneumovirus humano permite generar una inmunidad protectora contra la infección por el virus respiratorio Metapneumovirus, sin provocar efectos secundarios no aceptables, tales como hiper reactividad inflamatoria en las vías aéreas. Esta invención viene a solucionar un problema técnico que permanecía sin solución en el arte previo, que consiste en una formulación inmunogénica que otorgue protección contra infecciones por hMPV y no genere hiper reactividad inflamatoria.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Generación de la construcción pMV361-P-hMPV. A partir de RNA de metapneumovirus se realizó la transcripción reversa con partidores universales y posteriormente se amplificó con los partidores P-hMPV-Fw y P-hMPV-Rv del marco abierto de lectura del gen P. Al producto de amplificación se le incorporó los sitios *EcoRI* en ambos extremos y se insertó en el sitio *EcoRI* del vector micobacteriano pMV361 para generar la construcción del vector pMV361-P-hMPV. La **Figura 1A** muestra el genoma de hMPV, y el gen que codifica para la proteína P, y la **Figura 1B** muestra el vector pMV361-P-hMPV que incorpora dicho gen que codifica para la proteína P.

Figura 2. Expresión de la proteína P o proteína M2.1 de hMPV por cepas recombinantes de *Mycobacterium* BCG. Se electrotransformó la cepa Danish de *Mycobacterium* BCG con el plásmido pMV361-P-hMPV y se seleccionó en medio agar Middlebrook 7H10 suplementado con ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa que contiene kanamicina 20 µg/ml. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE (CB) y un Western Blot (WB), utilizando anticuerpos

monoclonales anti proteína P de hMPV (WB). Figura **2A**: western blot, utilizando anticuerpos monoclonales anti la proteína P de hMPV y Figura **2B**: western blot, utilizando anticuerpos monoclonales anti la proteína M2.1 de hMPV. En el SDS-PAGE se cargó 25 µg de proteína total preparada de cuatro clones de rBCG-P-hMPV (Figura **2A**) o cinco clones de rBCG-M2.1-hMPV (Figura **2B**). Como control positivo se cargaron 5 ng de proteína recombinante P-hMPV o 25 µg de hMPV inactivado según corresponda. Como control negativo se cargó proteína total de la cepa tipo silvestre de BCG y en el caso de rBCG-P-MPV además una BCG recombinante para el gen N de VRS (cepa N-5). Se puede apreciar que todos los clones analizados expresan la proteína del plásmido clonado, ya sea la proteína P, Figura **2A**, o la proteína M2.1, Figura **2B**.

Figura 3. Inmunización con rBCG-P-hMPV recombinante protege contra la infección con hMPV. Grupos de ratones BALB/c de 4-8 semanas de vida recibieron una dosis subdérmica de 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) de rBCG-M2.1-hMPV, rBCG-P-hMPV o BCG-WT (silvestre) también se vacunaron con 1×10^6 unidades formadoras de placas (UFP) de virus vivo (Live-hMPV) o virus inactivado por UV (UV-hMPV). Posteriormente todos los grupos fueron infectados vía intranasal con 1×10^6 ufp de hMPV. Como grupos control se incluyó animales sin vacunar y otro grupo de animales sin infectar. Durante los seis días posteriores a la infección se registró el peso de los animales y se sacrificaron al término del experimento y de cada uno se obtuvo el lavado bronco alveolar (BAL) y pulmón. Los símbolos representan a cada animal individual y la barra horizontal es la media. **(Figura 3 A)** Gráfico de la pérdida peso por grupo de animales posterior a la infección. **(Figura 3 B)** Total de células que infiltran las vías aéreas. **(Figura 3 C)** Porcentaje de células que dan reacción positiva a la doble tinción para CD11b y Gr1 en el BAL. **(Figura 3 D)** Determinación de RNA de hMPV en el pulmón de ratones infectados, mediante PCR cuantitativa. Se obtuvo RNA total del pulmón de cada animal sacrificado y se utilizó para producir cDNA mediante transcripción reversa. Posteriormente el cDNA generado se utilizó en una reacción de PCR cuantitativa para determinar el número de copias de RNA viral presente en la muestra respecto del número de copias del RNA de β-actina. En la Figura **3A** se puede apreciar que las vacunas recombinantes BCG para proteínas P (●) y M2 (◆) fueron protectoras en la pérdida de peso del animal posterior a la infección, obteniéndose un peso similar al animal sin infectar (▼). Por otra parte los animales sin inmunizar (▲) o inmunizados con BCG silvestre (BCG-WT) (■), Live-hMPV (■) o UV-hMPV (●) sufrieron

pérdida de peso corporal del animal posterior a la infección. En la Figura **3B** y **3C** se observa que la vacuna recombinante BCG para la proteína P previno la infiltración de células inmunes en las vías aéreas del animal posterior a la infección, obteniéndose una infiltración similar al animal sin infectar. Por otra parte los animales sin inmunizar o inmunizados con BCG silvestre, BCG-WT, Live-hMPV o UV-hMPV sufrieron la infiltración de células inmunes en sus vías aéreas posterior a la infección. La vacunación con rBCG-M2 confirió una protección incompleta. En la Figura **3D** se aprecia que el número de virus de hMPV expresados en copias del gen N-hMPV por 5000 copias de β -actina, presentes en los pulmones de animales infectados no inmunizados es similar al de animales infectados inmunizados con BCG-WT, Live-hMPV o UV-hMPV, es decir, no otorgarían protección, mientras que los animales infectados inmunizados con rBCG-P-MPV prácticamente no se encuentra el virus, al igual que en animales no infectados. La inmunización con rBCG-M2 otorgó una protección no completa.

Figura 4 La inmunización con rBCG-P-hMPV protege contra la inflamación después del desafío con hMPV. Los pulmones de animales removidos 6 días después del desafío con 1×10^6 UFP de hMPV, fueron fijados en paraformaldehído y e incluidos en parafina y cortes de 7 μm fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Se observa una significativa infiltración de células polimorfas nucleares en animales no inmunizados o inmunizados con rBCG-M2.1-hMPV o BCG-WT. Sin embargo, no se observan signos de inflamación en pulmones obtenidos de animales inmunizados con rBCG-P-hMPV. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. HSP representa la cuantificación de una puntuación de inflamación por grupo de animales (*Histopathology Score*). Se puede apreciar que la inflamación en animales inmunizados con rBCG-P-MPV e infectados fue muy baja o inexistentes, similar a lo apreciado en animales no infectados.

Figura 5. La inmunización con rBCG-P-hMPV produce un perfil de citoquinas tipo Th1. Para determinar cuál es el tipo de respuesta inmune responsable de la inmunidad por rBCG-P-hMPV, se analizó el perfil de citoquinas de células de bazo de BALB / cj inmunizados con la cepa BCG recombinante para proteína P de hMPV (rBCG-P-hMPV, en los gráficos: rBCG-P). Se recuperó el bazo de cuatro ratones BALB / cj inmunizados con rBCG-P-hMPV y las células de bazo se estimularon durante 7 días por incubación con 10 μg de proteína P-hMPV o PBS (en los gráficos U/S). Como control, las células de bazo de BALB / cj inmunizados con

BCG- WT se cultivaron en las mismas condiciones. El sobrenadante de las células de bazo de rBCG-P-hMPV y BCG-WT estimuladas y no estimuladas se les determinó por ELISA los niveles de **(A)** IFN- γ , **(B)** IL-2, **(C)** IL-5 y **(D)** IL-4 a los días 4 y 7 de cultivo. Las células de bazo derivadas de rBCG-P-hMPV estimuladas con proteína P-hMPV (rBCG-P) secretan cantidades significativamente mayores de IFN- γ en comparación con células provenientes de animales inmunizados con BCG-WT o células no estimuladas (rBCG-P U/S) (** $p < 0,001$, prueba *t* de Student), Figura 5 **A**. Además, las cantidades de IFN- γ aumentaron entre el día 4 a 7 (* $p < 0,05$, prueba *t* de Student), Figura 5 **A**. Las células de bazo estimuladas, de ratones inmunizados con rBCG-P-hMPV (rBCG-P) producen cantidades significativamente mayores de IL-2 al 4 día respecto de células no estimuladas (rBCG-P U/S) y disminuyó al nivel basal en el día 7 (**, $p < 0,001$; ns = no significativo prueba *t* de Student), Figura 5 **B**. Las células de bazo secretaron cantidades bajas de IL-5 e IL-4 sin mostrar incremento respecto de células de bazo provenientes de BCG-WT o no estimuladas (ns = prueba no significativa *t* de Student), Figura 5 **C**.

Figura 6. Transferencia de Linfocitos T de ratones inmunizados con rBCG-P-hMPV confieren resistencia a la infección por hMPV en ratones *naïve*. Se purificaron linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ desde esplenocitos estimulados y no estimulados con proteínas recombinantes virales. Se transfirió independientemente a través de la vena caudal de ratones *naïve*, dos millones de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, estimulados o sin estimular provenientes de animales inmunizados con rBCG-P-MPV o BCG-WT. Veinticuatro horas después de la transferencia, los ratones fueron infectados vía intranasal con 1×10^6 ufp de hMPV. En la Figura 6**A** los ratones transferidos con linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ de ratones inmunizados con rBCG-P-hMPV no muestran ninguna diferencia en el peso corporal en comparación con los ratones no infectados. Por el contrario se observa que los ratones transferidos con linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ de ratones inmunizados con BCG-WT, perdieron significativamente más peso tras la infección, en comparación con los animales no infectados ($p < 0,0001$) (Figura 6**B**). La figura 6**C** muestra que en el lavado bronco alveolar, BAL, de ratones *naïve* previamente transferidos con linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ de ratones inmunizado con rBCG-P-hMPV (P-CD8, P-CD4, P-CD8/4), presentan una infiltración significativamente menor de granulocitos en comparación a ratones transferidos con linfocitos T de BCG-WT (Wt-CD8, Wt-CD4, Wt-CD8/4) (** $p < 0,0001$, prueba *t* de Student). La infiltración de granulocitos en BAL de ratones transferidos con linfocitos T de BCG-WT o no

inmunizados no muestran diferencias significativas con infiltración de ratones que no recibieron linfocitos T (NS = no significativo, prueba t de Student). La Figura 7D muestra que la carga viral en los pulmones de ratones transferidos con linfocitos T (P-CD8, P-CD4, P-CD8/4) provenientes de ratones inmunizados con rBCG-P-hMPV, fue baja en comparación con la carga viral de ratones transferidos con linfocitos T (Wt-CD8, Wt-CD4, Wt-CD8/4) de animales inmunizados con la cepa BCG-WT y sin inmunizar (***, $p < 0,0001$, prueba t de Student). En los pulmones de ratones transferidos con linfocitos T de BCG-WT (Wt-CD8, Wt-CD4, Wt-CD8/4), la carga viral no muestra diferencias significativas con los ratones sin inmunizar (ns = no significativo, prueba t de Student). La carga viral se cuantificó como copias génicas de N-hMPV por RT-qPCR, como se describió anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención consiste en una formulación inmunogénica contra hMPV que comprende una cepa BCG recombinante que expresa la proteína P del Metapneumovirus humano. Esta formulación otorga protección efectiva contra infecciones por hMPV y no genera una respuesta de hiper reactividad inflamatoria.

La formulación de la invención se puede suministrar sola o mezclada con otras vacunas, como por ejemplo con una formulación inmunogénica contra VRS, en una dosis mixta que entregaría protección contra la infección y/o las complicaciones asociadas a hMPV y VRS.

La formulación inmunogénica detallada en esta invención puede ser utilizada para preparar vacunas que contengan bacterias recombinantes vivas atenuadas, provenientes de cultivos axénicos en dosis de entre 1×10^4 ufc a 1×10^{10} ufc por dosis, especialmente se prefieren dosis de 1×10^8 ufc por dosis. La formulación se presentará liofilizada con una solución reconstituyente que no necesita adyuvante, pues la composición de la envoltura celular de la bacteria recombinante es el adyuvante. La formulación inmunogénica liofilizada de la invención se debe conservar entre 4 y 8° C, protegida de luz solar directa e indirecta, en presentación de dos frascos separados, uno con la bacteria recombinante liofilizada, y otro con la solución salina reconstituyente, a mezclar previa a su administración.

Desde su introducción en 1921, la vacuna basada en *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) se ha utilizado en más de mil millones de personas y se utiliza actualmente alrededor del mundo contra la tuberculosis.

5 Los inventores han encontrado que una manera de desplazar el equilibrio de la respuesta inmune desde una respuesta de tipo Th2 pro inflamatoria cuya protección no es duradera en el tiempo hacia una respuesta de tipo Th1 basada en células, específicamente células T CD8⁺ citotóxicas y células T CD4⁺ helper es utilizar adyuvantes como los componentes de la pared celular de *Mycobacterium*. Específicamente, expresar la proteína inmunogénica de hMPV en *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG).

10 Las proteínas F y G de hPMV se encuentran en la superficie de la partícula viral y por lo tanto son accesibles a anticuerpos circulantes. Por esta razón dichas proteínas serían la elección más obvia para realizar una vacuna basada en la producción de anticuerpos para prevenir una infección por hMPV.

No obstante lo anterior, en la presente invención se ha escogido utilizar como inmunógeno
15 proteínas de la cápside no expuestas, específicamente la proteína P, acompañada de un adyuvante que promueve una respuesta basada en células de tipo Th1, como es la bacteria atenuada *Mycobacterium bovis* BCG. Se ha visto que proteínas de la cápside como M2.1 de hMPV promueven la activación de linfocitos citotóxicos (LTC). Sorprendentemente, en la presente invención se describe que el uso de la proteína P, una proteína no expuesta del virus
20 hMPV al ser utilizada como proteína inmunógena, expresada por *Mycobacterium* permite formular una composición inmunogénica que, al ser utilizada como vacuna o composición inmunogénica, otorga una protección efectiva sin efectos secundarios indeseados tales como hiper-reactividad inflamatoria

Las proteínas recombinantes expresadas por la bacteria vector utilizada en esta invención se
25 obtiene mediante la clonación de los genes que las codifican provenientes del virus hMPV del grupo A en vectores de expresión procariontes, todos disponibles comercialmente. El genoma de Metapneumovirus (hMPV) ha sido descrito con anterioridad y se encuentra disponible en las bases de datos de GeneBank, número de acceso: AB503857.1, DQ843659.1, DQ843658.1, EF535506.1, GQ153651.1, AY297749.1, AY297748.1, AF371337.2, FJ168779.1, FJ168778.1, NC_004148.2 y AY525843.1. La obtención de la cepa bacteriana recombinante
30

descrita en esta invención, considera la expresión heteróloga de las proteínas virales durante la replicación bacteriana en el hospedero. Las secuencias de DNA heterólogo se integran al DNA cromosómico bacteriano mediante el vector de expresión pMV361. Estas proteínas de hMPV pueden ser modificadas genéticamente, como por ejemplo, mediante la incorporación de secuencias peptídicas o dominios de glicosilación y/o posterior destinación a receptores endocíticos o fagocíticos de células presentadoras de antígeno, mediante su acoplamiento a ligandos naturales mediante el uso del sistema biotina-estreptavidina (utilizando para ello kits comerciales de biotilación y modificación genética de las proteínas virales mediante acoplamiento a la proteína bacteriana estreptavidina, o bien, mediante la introducción de la secuencia genética codificante de secuencias aminoácidas descritas como señales de biotilación en las proteínas o fragmentos proteicos recombinantes, utilizando técnicas previamente descritas para sistemas de expresión heteróloga procarionte y/o eucarionte) .

La formulación inmunogénica de la invención comprende la expresión de la proteína P de hMPV ya sea completa o un fragmento inmunogénico de la misma, en una cepa atenuada de *Mycobacterium*. Especialmente se prefiere que la cepa de *Mycobacterium* recombinante atenuado se derive de la cepa *Bacillus Calmette-Guerin (BCG)*. La proteína P de hMPV puede corresponder a la proteína P de Metapneumovirus de los subtipos A o B.

La cepa atenuada de *Mycobacterium* recombinante de la invención puede contener las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para la proteína P de hMPV o su fragmento inmunogénico insertado en el genoma de la bacteria o en un plásmido extracromosomal, en una o más copias. La expresión de la proteína puede estar bajo el control de promotores constitutivos o inducibles, endógenos o exógenos de *Mycobacterium BCG*.

La proteína P de hMPV o su fragmento inmunogénico puede expresarse en forma soluble, soluble-citoplasmática, como proteína extracelular secretada, o unida a membrana.

La formulación inmunogénica de la invención puede comprender dos o más cepas atenuadas recombinantes de *Mycobacterium*, y en el que las proteínas o fragmentos inmunogénicos de proteína P de hMPV de las cepas se expresan para generar un número diferente de copias, se expresan constitutivamente o inducibles, y / o están ubicados en diferentes localizaciones celulares.

La formulación inmunogénica que se divulga en la presente invención puede ser utilizada en conjunto con formulaciones inmunogénicas que contienen otras formulaciones antigénicas contra virus diferentes de hVRS y hMPV, con cepas atenuadas de BCG y vacunas estacionales contra influenza A y B.

- 5 La formulación inmunogénica anteriormente descrita puede ser aplicada al individuo de forma subcutánea/subdérmica en conjunto con una solución salina tampón (PBS, tampón fosfato de sodio) o fisiológica.

Para desarrollar la bacteria recombinante *Mycobacterium* que expresa la proteína P de hMPV, en primer lugar debe generarse un vector que exprese dicha proteína. Puede utilizarse
10 cualquier vector de expresión micobacteriano conocido, y debe insertarse el gen que codifica para la proteína P del virus hMPV en fase con su región promotora. En una realización preferida se realiza una transcripción reversa con partidores universales desde el RNA de metapneumovirus humano aislado. Posteriormente el gen de la proteína P se amplifica con partidores específicos (Figura 1A). El producto de amplificación se inserta en el vector de
15 expresión. En la presente invención se ha utilizado el vector de expresión micobacteriano pMV361, generando el vector pMV361-P-hMPV (Figura 1B).

Una vez obtenido el vector se utiliza para transformar la cepa *Mycobacterium*, tal como *Mycobacterium* BCG. Para efectos de la invención puede utilizarse cualquier cepa BCG conocida, como por ejemplo BCG Danish o BCG Pasteur. El método de transformación puede
20 ser cualquier método disponible, especialmente se prefiere electrotransformación. Posteriormente se deben seleccionar las células transformadas que expresan proteína P de hMPV.

Estas células recombinantes constituyen la formulación inmunogénica de la invención, la que se provee en cantidades de entre 10^4 a 10^9 UFC/dosis en un tampón salino
25 farmacológicamente aceptable.

Adicionalmente la formulación de la invención puede formularse en combinación con cepas BCG recombinantes que expresen proteínas inmunogénicas de virus sincicial (VRS). En una realización preferida la bacteria recombinante BCG que expresa la proteína P de hMPV se provee en conjunto con bacterias recombinantes BCG que expresan proteínas N, P, M, F, M2
30 (ORF1 y 2), SH, G o L de VRS. En una realización más preferida la formulación

inmunogénica de la invención se utiliza en combinación con una cepa BCG recombinante para el gen N de VRS. Especialmente se prefiere la combinación de BCG recombinante para el gen P de hMPV subtipo A y BCG recombinante para el gen N de VRS subtipo A.

En otra realización de la invención se transforma una cepa de BCG con un vector que expresa la proteína P de hMPV y posteriormente la célula transformada se vuelve a transformar con un vector que exprese una proteína de virus sincicial (VRS). La proteína de VRS se escoge entre N, P, M, F, M2 (ORF1 y 2), SH, G o L. Especialmente se prefiere transformar en primer lugar con un vector que expresa la proteína P de hMPV subtipo A, y en segundo lugar someter estas cepas transformadas a una segunda transformación con un vector que exprese el gen N de VRS subtipo A, obteniendo una cepa BCG que expresa simultáneamente las proteínas P de hMPV subtipo A y N de VRS subtipo A.

La formulación inmunogénica de la invención se puede proveer liofilizada en una presentación multidosis lista para reconstituirse en 1 ml de una solución salina adjunta, para obtener una solución 1×10^9 ufc / ml de solución reconstituida. Cada 0,1 ml de solución resuspendida contendrá la dosis apropiada de 1×10^8 ufc para la administración.

Para preparar la solución liofilizada las cepas transformadas de la invención pueden suspenderse en cualquier solución de liofilización apropiada, por ejemplo se puede emplear el tampón LYO C, compuesto por manitol al 4% (w/v), Tyloxapol al 0,05% (w/v), sacarosa al 0,25% e histidina 5 mM. para luego ser liofilizada y conservada a 25°C.

La solución reconstituyente puede ser cualquier solución disponible en la técnica, en una realización se prefiere una solución diluida Sauton SSI (125 µg MgSO_4 , 125 µg K_2HPO_4 , 1 mg L-asparagina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H_2O) a -80°C. En otra realización la formulación de la invención puede suspenderse en una solución de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentración final de 10^8 bacterias por 100 µl y conservadas a -80°C. Ambos en presencia de un detergente no iónico como Tween®-80 al 0,1% o Tyloxapol al 0,05%.

La formulación de la invención debe mantenerse entre 4 a 8°C, antes y después de reconstituir, en todo momento alejada de la luz solar directa e indirecta y una vez reconstituida deberá eliminarse al final del día.

Los siguientes ejemplos de la generación y uso de la formulación inmunogénica contra hMPV a base de la bacteria recombinante *Mycobacterium* que expresa proteínas virales son solamente ilustrativos y no pretenden limitar el rango de producción o aplicación de la invención. Aunque en las siguientes descripciones se utilicen términos específicos, su uso es sólo descriptivo y no limitante.

EJEMPLOS

Ejemplo I: Generación de un vector recombinante permite la expresión de la proteína P del hMPV en la bacteria Mycobacterium BCG.

A partir de RNA de metapneumovirus se amplificó la región codificante del gen P utilizando los siguientes partidores: P-hMPV_Fw: GAATTCATGTCATTCCCTGAAGGAAA (SEQ ID No 1) y P-hMPV_Rv: GAATTCCTACATAATTAAGTGGTAAA (SEQ ID No 2), donde las secuencias subrayadas incorporan el sitio EcoRI en ambos extremos del producto de amplificación, Figura 1A. El vector micobacteriano pMV361 se linearizó en el sitio EcoRI, lo que permitió insertar la siguiente secuencia correspondiente al gen P de hMPV:

GAATTCATGTCATTCCCTGAAGGAAAAGATATTCTTTTCATGGGTAATGAAGCGGCAAAATTGGCAGAAGCTTTC
CAAAAATCATTAAAGAAAACCTAGTCATAAAAGATCTCAATCTATTATAGGAGAAAAAGTGAACACTGTATCTGAA
ACATTGGAATTACCTACTATCAGTAGACCTACCAAACCGACCATATTGTCAGAGCCGAAGTTAGCATGGACAGAC
AAAGGTGGGGCAATCAAACTGAAGCAAAGCAAACAATCAAAGTTATGGATCCTATTGAAGAAGAAGAGTTTACT
GAGAAAAGGGTGCTGCCCTCCAGTGATGGGAAAACCTCGCAGAAAAGAAGTTGAAACCATCAACCAATACTAAA
AAGAAGGTCTCATTTACACCAAATGAACCAGGAAAAATACACAAAGTTGGAGAAAAGATGCTCTAGACTTGCTTTCA
GACAATGAAGAAGAAGATGCAGAATCCTCAATCTTAACCTTCGAAGAAAGAGATACTTCATCATTAAGCATTGAA
GCCAGACTAGAATCGATTGAGGAGAAATTAAGCATGATATTAGGGCTATTAAGAACACTCAACATTGCTACAGCA
GGACCCACAGCAGCAAGAGATGGGATCAGAGATGCAATGATTGGCATAAGGGAGGAACTAATAGCAGACATAATA
AAAGAAGCCAAGGGAAAAGCAGCAGAAATGATGGAAGAAGAAATGAACCAGCGGACAAAAATAGGAAACGGTAGT
GTAAAATTAAGTGAAGGCAAGGAGCTCAACAAAATTGTTGAAGACGAGAGCACAAGTGGTGAATCCGAAGAA
GAAGAAGAACTAAAGACACACAGGAAAATAATCAAGAAGATGACATTTACCAGTTAATTATGTAGGAATTC
(SEQ ID No 3)

La inserción del marco de lectura abierto del gen P de hMPV en el sitio EcoRI del vector pMV361 lo posiciona bajo el control del promotor hsp60 y dio origen a la construcción pMV361-P-hMPV (Figura 1B).

Ejemplo II: Formulaci3n inmunog3nica compuesta por 10 dosis de 1×10^8 UFC cada una de la cepa BCG Danish recombinante para el gen P de hMPV subtipo A.

El gen P de hMPV subtipo A se encuentra inserto en una copia en el genoma de la bacteria
5 bajo la regulaci3n del promotor end3geno constitutivo *hsp60* de *Mycobacterium* BCG para la expresi3n de la prote3na.

La cepa *Mycobacterium* BCG Danish (ATCC 35733) fue transformada mediante electrotransformaci3n con el pl3smido pMV361-P-hMPV, derivado del pl3smido pMV361 (Stover *et al.*, 1991), que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este pl3smido
10 contiene el gen que codifica para la prote3na P de hMPV subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor end3geno y constitutivo del gen *hsp60* de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron (a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 (4,9 g/L), suplementado) hasta $OD_{600nm}=1$, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en soluci3n PBS (137 mM NaCl; 2,7
15 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentraci3n final de 10^8 bacterias por 100 μ l y se conservaron a -80°C.

Del mismo modo, las cepas pueden resuspenderse en una soluci3n volumen:volumen de lactosa 25% y Medio Proskauer y Beck suplementado con glucosa y Tween 80 (PBG: 0,5 g
20 asparagina; 5,0 g fosfato monopotasio; 1,5 g citrato de magnesio; 0,5 g sulfato de potasio; 0,5 ml Tween 80 y 10,0 g glucosa por litro de agua destilada) para luego ser liofilizada y conservada a 25°C.

Por Western blot, con el uso de anticuerpos para la prote3na P de hMPV, puede observarse que esta cepa de BCG expresa de manera constitutiva la prote3na P de hMPV subtipo A en el
25 citoplasma (Figura 2A).

La inmunizaci3n de ratones BALB/c con una dosis subd3rmica de 1×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) de rBCG-P-hMPV, a modo de vacuna, confiere protecci3n de estos animales contra una infecci3n intranasal con 10^6 unidades formadoras de placa de hMPV subtipo A (**Figura 3**). Se compar3 el efecto de la vacuna de la invenci3n, rBCG-P-

hMPV, con una vacuna rBCG que expresa otra proteína de hMPV, la proteína M2, y con BCG sin transformar, como control se utilizó un grupo sin inmunizar, todos estos grupos se infectaron con hMPV por vía intranasal, también se incluyó un control sin inmunizar y sin infectar. Se analizó la variación de peso de los animales después de la infección, los resultados se muestran en la Figura 3A. Ambas vacunas recombinantes BCG para proteínas P (●) y M2 (◆) de hMPV fueron protectoras en la pérdida de peso del animal posterior a la infección, obteniéndose un peso similar al animal sin infectar (▼). Por otra parte los animales sin inmunizar (▲) o inmunizados con BCG silvestre (BCG-WT) (■), Live-hMPV (■) o UV-hMPV (●) sufrieron pérdida de peso corporal del animal posterior a la infección.

Se analizó además la infiltración de células inmunes en las vías aéreas del animal posterior a la infección, parámetro indicativo del desarrollo de la enfermedad. Esto se analizó por el número de células infiltradas en la vía aérea (Figura 3B) y por las células infiltradas que al ser positivas para CD11b y Gr1 corresponden a granulocitos (Figura 3C). En la Figura 3 B, se aprecia que sólo la vacuna de la invención rBCG-P-hMPV previno la infiltración de linfocitos en la vía aérea, obteniéndose una infiltración similar al animal sin infectar. Por otra parte los animales sin inmunizar o inmunizados con otras vacunas BCG silvestre (BCG-WT) o rBCG-M2-hMPV, sufrieron la infiltración de células inmunes en sus vías aéreas posterior a la infección. La vacunación con rBCG-M2 confirió una protección incompleta para la infiltración de células inmunes en las vías aéreas del animal.

Adicionalmente se analizó el número de copias de RNA del gen N-hMPV en las células de pulmón de los distintos grupos estudiados. Un mayor número de copias de RNA del virus hMPV es indicativo de una mayor infección, los resultados se normalizan por copias de β -actina. Los resultados se muestran en la Figura 3D. Se aprecia que el número de virus de hMPV, presentes en los pulmones de animales infectados no inmunizados es similar al de animales infectados inmunizados con BCG-WT, Live-hMPV o UV-hMPV, es decir, estas inmunizaciones no otorgarían protección. Se observa que la inmunización con rBCG-M2 otorgó una protección no completa. Por otra parte, en los animales infectados inmunizados con la vacuna de la invención rBCG-P prácticamente no se encuentra el virus, tienen resultados similares al grupo de animales no infectados. Esto comprueba que la formulación de la invención protege efectivamente contra la infección de hMPV.

Ejemplo III: Formulaci3n inmunog3nica que consiste en 5×10^7 bacterias de la cepa *Mycobacterium BCG Danish* recombinante para el gen P de hMPV subtipo A y 5×10^7 bacterias de la cepa *Mycobacterium BCG Danish* recombinante para el gen N de VRS subtipo A.

- 5 En cada una de las bacterias que componen la formulaci3n inmunog3nica, los genes de hMPV y de VRS se encuentran insertos en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulaci3n del promotor end3geno constitutivo *hsp60* de BCG y la expresi3n de la prote3na es citoplasm3tica. La formulaci3n inmunog3nica se encuentra preservada en PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), suplementado con
- 10 Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentraci3n final de 10^8 bacterias por 100 μl y se conservaron a -20°C .

- Cepas BCG Danish (ATCC 35733) fueron transformadas mediante electrotransformaci3n con el pl3smido pMV361-P de hMPV para dar la cepa de la invenci3n rBCG-P-MPV, y adicionalmente un segundo grupo fue transformado con pMV361-N de VRS para obtener la
- 15 cepa transformada rBCG-N VRS, estos pl3smidos son derivados del pl3smido pMV361 (Stover *et al.*, 1991), los cuales se insertan una sola vez en el genoma de la bacteria. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado hasta $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 1$, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una soluci3n PBS (137 mM NaCl;
- 20 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), suplementado con Glicerol 20% y Tween 80 0,02% a una concentraci3n final de 10^7 bacterias por 100 μl y se conservaron a -20°C . Las cepas se resuspendieron en tamp3n LYO C, compuesto por manitol al 4% (w/v), Tyloxapol al 0,05% (w/v), sacarosa al 0,25% e histidina 5 mM, luego fueron liofilizadas y conservadas a 4°C . Por Western blot, con el uso de anticuerpos espec3ficos para la prote3na P de hMPV o la prote3na y N de VRS, se observ3 que estas cepas de BCG Danish expresan de
- 25 manera recombinante, la prote3nas P de hMPV o N de VRS, subtipo A respectivamente (Figura 2). Una formulaci3n inmunog3nica comprendiendo ambas cepas transformadas conferir3 inmunidad simult3nea contra los virus hMPV y VRS.

Ejemplo IV: Formulación inmunogénica de 10^4 bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen P de hMPV subtipo A.

- Se transformó una cepa de BCG Danish con el gen P de hMPV subtipo A, de modo que el gen se insertó en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor endógeno inducible *acr* de BCG, el cual es activo en respuesta a óxido nítrico, baja concentraciones de oxígeno, y fases estacionarias de crecimiento. La expresión de la proteína es citoplasmática. La formulación inmunogénica se liofilizó en tampón LYO C, compuesto por manitol al 4% (w/v), Tyloxapol al 0,05% (w/v), sacarosa al 0,25% e histidina 5 mM y fue conservarse reconstituida 25°C en solución diluida Sauton SSI (125 µg MgSO₄, 125 µg K₂HPO₄, 1 mg L-asparagina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H₂O). Alternativamente las cepas transformadas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^4 bacterias por 100 µl.
- La cepa BCG Danish (American Type Culture Collection, www.atcc.org, ATCC number 35733) fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido pMV361_{Pacr}/P-hMPV, derivado del plásmido pMV361 (Stover *et al.*, 1991), que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína P de hMPV subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor endógeno e inducible del gen *acr* de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron (a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado) hasta OD_{600 nm} =1, fueron centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una solución tampón LYO C, compuesto por manitol al 4% (w/v), Tyloxapol al 0,05% (w/v), sacarosa al 0,25% e histidina 5 mM. Finalmente se liofilizaron alícuotas de 1 ml con 10^4 bacterias y se conservaron a 25°C.
- Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10^4 bacterias por 100 µl. Esta formulación inmunogénica confiere inmunidad contra el virus hMPV.

Ejemplo V: Formulación inmunogénica que consiste en 10⁹ bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para el gen P de hMPV subtipo A.

El gen se encuentra inserto en una copia en el genoma de la bacteria bajo la regulación del promotor exógeno del fago T7 de expresión constitutiva en cepas de BCG que co-expresen la polimerasa del fago T7. La expresión de la proteína es citoplasmática. La formulación inmunogénica se encuentra en una solución diluida Sauton SSI (125 µg MgSO₄, 125 µg K₂HPO₄, 1 mg L-asparagina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H₂O) y fue conservada a -20°C, o puede encontrarse liofilizada y conservada a 4°C. Del mismo modo, las cepas pueden preservarse en una solución PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) suplementado con Tween 80 0,02% y Glicerol 20% a una concentración final de 10⁹ bacterias por 100 µl.

La cepa BCG Danish ATCC 35733 fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido pMV361_{PT7}/P-hMPV, derivado del plásmido pMV361 (Stover *et al.*, 1991), que se inserta una sola vez en el genoma de la bacteria. Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína P de hMPV subtipo A, el cual se expresa bajo el promotor T7 activado por la expresión de la polimerasa del fago T7.

La cepa BCG resultante fue transformada mediante electrotransformación con el plásmido pMV261_{Amp}/PolT7, derivado del plásmido pMV261 (Stover *et al.*, 1991), el cual reside extracromosomalmente en la bacteria en múltiples copias. En este plásmido la resistencia al antibiótico kanamicina ha sido reemplazada por la resistencia al antibiótico higromicina (Higr). La polimerasa T7 del fago T7 se encuentra bajo control del promotor constitutivo del gen *hsp60* de BCG. Las colonias recombinantes resultantes se crecieron a 37°C en medio de cultivo Middlebrock 7H9 suplementado hasta OD_{600 nm} =1, se centrifugaron a 4.000 rpm por 20 min (rotor eppendorf modelo 5702/R A-4-38) y se resuspendieron en una solución diluida Sauton SSI (125 µg MgSO₄, 125 µg K₂HPO₄, 1 mg L-asparagina, 12,5 µg citrato de amonio férrico, 18,4 mg 85% glicerol, 0,5 mg ácido cítrico en 1 ml de H₂O) y fue conservada a -80°C. Esta formulación inmunogénica confiere inmunidad contra el virus hMPV.

Ejemplo VI: La inoculación de 10^8 bacterias de la cepa BCG Danish recombinante para gen P-hMPV en cualquiera de sus formulaciones inmunogénicas, protege del daño inmunopatológico.

La inoculación de la cepa recombinante BCG que expresa la proteína P de metapneumovirus en cualquiera de sus presentaciones protege de los signos y síntomas clínicos de la infección con la cepa A y B de hMPV. Disminuye la anorexia provocada por la fiebre y el malestar general (**Figura 3A**), además de la infiltración de las vías aéreas (**Figura 3B 3C**). También disminuye la replicación y diseminación de las cepas A y B hMPV (**Figura 3D**).

La inoculación de la formulación en cualquiera de sus presentaciones también disminuye significativamente las manifestaciones histopatológicas de la infección por las cepas A y B del hMPV. Los pulmones de los animales vacunados con la formulación demuestran una mucha menor infiltración de células inmunes, pérdida de estructura e inflamación de los tejidos pulmonares respecto de animales no inmunizados o inmunizados con la cepa de tipo silvestre (**Figura 4**).

La inoculación de la formulación con la BCG recombinante que expresa la proteína P de hMPV en cualquiera de sus presentaciones genera una inmunidad basada en células que puede transferirse a individuos *naïve* mediante la recuperación y purificación de linfocitos T desde individuos donantes inmunizados (**Figura 6**).

Los ejemplos anteriores se hacen extensivos a formulaciones inmunológicas que contenga una cepa recombinante de *Mycobacterium* atenuada que exprese la proteína P de hMPV o parte sustancial de la misma, así como todas las combinaciones con formulaciones inmunológicas que contenga una cepa recombinante de *Mycobacterium* atenuada que exprese cualquiera de las proteínas NS2, N, P, M, SH, M2 (ORF1), M2 (ORF2), L, F o G de VRS. Así mismo los ejemplos se hacen extensivos a formulaciones inmunológicas que contienen una o varias cepas recombinantes de *Mycobacterium* atenuadas; donde dichas bacterias recombinantes contienen genes de proteínas, o fragmentos inmunogénicos de la proteína P de hMPV que se encuentre insertos ya sea en el genoma bacteriano o en plásmidos extracromosomales, en una o varias copias, y su expresión este comandada por promotores endógenos o exógenos, constitutivos o inducibles, expresadas, de forma soluble-citoplasmática, secretada extracelularmente o como proteínas unidas a la membrana celular.

Referencias

- 5 **Biacchesi, S., Pham, Q. N., Skiadopoulos, M. H., Murphy, B. R., Collins, P. L. & Buchholz, U. J. (2005).** Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* **79**, 12608-12613.
- 10 **Cseke, G., Wright, D. W., Tollefson, S. J., Johnson, J. E., Crowe, J. E., Jr. & Williams, J. V. (2007).** Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol* **81**, 698-707.
- 15 **Denis, F., Alain, S., Hantz, S. & Lagrange, P. (2005).** [Antiviral vaccination and respiratory mucosal immunity: still disappointing results from a seductive idea]. *Presse Med* **34**, 1245-1253.
- 20 **Hamelin, M. E., Couture, C., Sackett, M., Kiener, P., Suzich, J., Ulbrandt, N. & Boivin, G. (2008).** The prophylactic administration of a monoclonal antibody against human metapneumovirus attenuates viral disease and airways hyperresponsiveness in mice. *Antivir Ther* **13**, 39-46.
- 25 **Herfst, S., de Graaf, M., Schrauwen, E. J., Sprong, L., Hussain, K., van den Hoogen, B. G., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2008a).** Generation of temperature-sensitive human metapneumovirus strains that provide protective immunity in hamsters. *J Gen Virol* **89**, 1553-1562.
- 30 **Herfst, S., Schrauwen, E. J., de Graaf, M., van Amerongen, G., van den Hoogen, B. G., de Swart, R. L., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2008b).** Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine* **26**, 4224-4230.
- 35 **Karron, R. A., Wright, P. F., Belshe, R. B. & other authors (2005).** Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis* **191**, 1093-1104.
- 40 **Kolli, D., Bataki, E. L., Spetch, L., Guerrero-Plata, A., Jewell, A. M., Piedra, P. A., Milligan, G. N., Garofalo, R. P. & Casola, A. (2008).** T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *J Virol* **82**, 8560-8569.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R. & other authors (1991).** New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456-460.
- Yim, K. C., Cragin, R. P., Boukhvalova, M. S., Blanco, J. C., Hamlin, M. E., Boivin, G., Porter, D. D. & Prince, G. A. (2007).** Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. *Vaccine* **25**, 5034-5040.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación inmunogénica que confiere protección contra la infección por el metapneumovirus (hMPV) y/o atenúa la patogenicidad causada por hMPV,
5 CARACTERIZADA porque la formulación comprende una o más cepas atenuadas de *Mycobacterium* recombinante en una cantidad que va de 10^4 a 10^9 bacterias (CFU/dosis) por cepa, donde cada cepa expresa la proteína P o un fragmento inmunogénico de la proteína P de hMPV, en un tampón salino farmacológicamente aceptable.
- 10 2. La formulación inmunogénica según la cláusula 1, CARACTERIZADA porque la cepa de *Mycobacterium* recombinante atenuado se deriva de la cepa Bacillus Calmette-Guerin (BCG).
- 15 3. La formulación inmunogénica según la cláusula 1, CARACTERIZADA porque el metapneumovirus comprende es del subtipo A, B o ambos subtipos.
- 20 4. La formulación inmunogénica según la cláusula 1, CARACTERIZADA porque las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para la proteína P o fragmento inmunogénico de la proteína P de hMPV, se inserta en el genoma de una cepa atenuada de *Mycobacterium* o se inserta en un plásmido extracromosomal, en una o más copias, de tal manera que la proteína viral o fragmento inmunogénico se expresa a partir de las secuencias de ácidos nucleicos.
- 25 5. La formulación inmunogénica según la cláusula 1, CARACTERIZADA porque la formulación comprende dos o más cepas atenuadas recombinantes de *Mycobacterium*, y en donde cada una comprende dos o más cepas de *Mycobacterium* atenuada recombinante, y en donde cada una de las cepas expresa una proteína o fragmento inmunogénico de proteína P de hMPV en una ubicación diferente, ya sea como una forma soluble, soluble-citoplasmática, como proteína extracelular secretada, o unida a membrana.
- 30 6. La formulación inmunogénica según la cláusula 1, CARACTERIZADA porque las proteínas o fragmentos inmunogénicos derivan de la expresión de ácidos nucleicos que

están bajo el control de promotores constitutivos o inducibles, endógenos o exógenos de *Mycobacterium* BCG.

- 5 7. La formulación inmunogénica de la cláusula 1, CARACTERIZADA porque dicha formulación comprende dos o más cepas atenuadas recombinantes de *Mycobacterium*, y en el que las proteínas o fragmentos inmunogénicos de la proteína P de hMPV de las cepas se expresan para generar un número diferente de copias, se expresan constitutivamente o inducibles, y / o están ubicados en diferentes localizaciones celulares.
- 10 8. La formulación inmunogénica de la cláusula 1, CARACTERIZADA porque la formulación se estabiliza por congelación, secado por congelación o el uso de una solución salina tamponada para la conservación antes de su uso.
- 15 9. La formulación inmunogénica según la cláusula 1, CARACTERIZADA porque la proteína o fragmentos inmunogénicos se expresan como proteínas citoplasmáticas solubles, se secretan extracelularmente, o están unidos a la membrana celular.
- 20 10. Método para la protección contra la infección por hMPV o patología provocada por hMPV, CARACTERIZADA porque comprende administrar al sujeto la composición inmunogénica de la cláusula 1.
11. El método de la cláusula 10, CARACTERIZADA porque dicha formulación se administra por vía subcutánea, percutánea o subdérmica.
- 25 12. Una vacuna contra hMPV, CARACTERIZADA porque comprende una formulación inmunogénica de la cláusula 1.
13. La vacuna de la cláusula 12, CARACTERIZADA porque se formula para administración subcutánea, percutánea, o administración subdérmica.
- 30 14. La vacuna de la reivindicación 13, CARACTERIZADA porque las proteínas o fragmentos inmunogénicos de la proteína expresada es P de hMPV.

PCT

Impresión (original en formato electrónico)

VIII-2-1	Declaración: Derecho para solicitar y que sea concedida una patente Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente (Reglas 4.17.ii) y 51bis.1.a)ii)), en caso de que no proceda la declaración según la Regla 4.17.iv): Nombre (APELLIDOS, Nombre)	Respecto de esta solicitud internacional PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE tiene derecho a solicitar y a que le sea concedida una patente en virtud de lo siguiente:
VIII-2-1(i v)		una cesión de BUENO RAMIREZ, Susan Marcela a PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE, datado 03 Abril 2014 (03.04.2014)
VIII-2-1(i v)		una cesión de KALERGIS PARRA, Alexis Mikes a PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE, datado 03 Abril 2014 (03.04.2014)
VIII-2-1(i v)		una cesión de PALAVECINO BEAUMONT, Christian a PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE, datado 03 Abril 2014 (03.04.2014)

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
9 de abril de 2015 (09.04.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/049633 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/45 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2014/064963

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de septiembre de 2014 (30.09.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
CL2013-02829
1 de octubre de 2013 (01.10.2013) CL

(71) Solicitante: PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE CHILE [CL/CL]; Avenida Libertador Bernardo O
Higgins 340, Santiago, Santiago, 8331150 (CL).

(72) Inventores: BUENO RAMIREZ, Susan Marcela;
Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340, Santiago,
Santiago, 8331150 (CL). KALERGIS PARRA, Alexis
Mikes; Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340,
Santiago, Santiago, 8331150 (CL). PALAVECINO
BEAUMONT, Christian; Avenida Libertador Bernardo O
Higgins 340, Santiago, Santiago, 8331150 (CL).

(74) Mandatario: CLARKE, MODET & CO. CHILE;
Huerfanos 835, Piso 10, Of. 1001, Santiago, Santiago,
8320176 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,

KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: IMMUNOGENIC FORMULATION CONTAINING RECOMBINANT LIVE BCG THAT EXPRESS ANTIGENS OF METAPNEUMOVIRUS (hMPV), IN A SUSPENSION PREPARED FROM A LYOPHILISATE, WITHOUT REQUIRING AN ADJUVANT, SUITABLE FOR PHARMACEUTICAL USE

(54) Título : FORMULACION INMUNOGENICA QUE CONTIENE BCG VIVAS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTIGENOS DE METAPNEUMOVIRUS (hMPV), EN UNA SUSPENSION QUE SE PREPARA A PARTIR DE UN LIOFILIZADO SIN LA NECESIDAD DE ADYUVANTE, APTA PARA SU USO FARMACEUTICO.

(57) Abstract: The present invention relates to an immunogenic formulation to be used in mammals against human Metapneumovirus (hMPV), consisting of a lyophilisate of 1×10^9 ufc/ml of recombinant BCG that expresses the viral protein P of hMPV (of genogroups A1, A2, B1 and B2). The vaccine is derived from the full or partial product of the P gene of hMPV, capable of being used, stabilised and administered in solution without requiring adjuvants. The preparation can also contain combinations of the aforementioned formulations. The formulation is stabilised by means of lyophilisation (conservation range of between 4°C and 8°C) in order to be subsequently reconstituted in an adjuvant-free saline solution prior to use.

(57) Resumen: La presente invención describe una formulación inmunogénica para ser utilizada en mamíferos contra Metapneumovirus humano (hMPV) consistente en un liofilizado de 1×10^9 ufc/ml de BCG recombinantes que expresa la proteína viral P de hMPV (de los genogrupos A1, A2, B1 y B2). La vacuna esta derivada del producto completo o parcial del gen P de hMPV pudiendo ser utilizadas, estabilizadas y administradas en solución sin la necesidad de adyuvantes. La preparación puede contener además combinaciones de formulaciones descritas anteriormente. La formulación está estabilizada por liofilización (rango de conservación entre 4°C y 8°C), para ser posteriormente reconstituida en una solución salina sin adyuvante previo a su uso.

WO 2015/049633 A1

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 · Fax: (57 1) 6350824 · Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

I (we), the undersigned

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

legal representative(s) of

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

una Corporación de Derecho Público, legalmente constituida de acuerdo a las leyes Chilenas

an Public Law Corporation, legally constituted in accordance with Chilean law

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en **Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340 Santiago Santiago, 8331150, Chile**

and in present execution of its business activity, domiciled at **Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340 Santiago Santiago, 8331150, CH**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, con Cédula de Ciudadanía No. 66.783.790 de Palmira Valle, y tp. 141563 con domicilio en Carrera 11 N° 86-53 Piso 6, Bogotá, Colombia, para que actuando en nombre del (de la) otorgante le (la) represente ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, identification card No. 66.783.790 of Palmira Valle, and tp. 141563 residing in Carrera 11 N° 86-53 Piso 6, Bogotá Colombia, to act in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

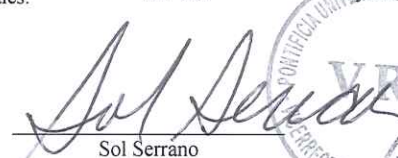
- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseññas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella)
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato la arriba mencionada queda facultada para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a la mencionada abogada para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorney with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Dado y firmado en Santiago de Chile
a los 28 días de marzo de 2016

Granted and signed at

on this _____ day of _____ of _____


Sol Serrano
Vicerrectora de Investigación
Pontificia Universidad Católica de Chile



FORMULACION INMUNOGENICA QUE CONTIENE BCG VIVAS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTIGENOS DE METAPNEUMOVIRUS (hMPV), EN UNA SUSPENSION QUE SE PREPARA A PARTIR DE UN LIOFILIZADO SIN LA NECESIDAD DE ADJUVANTE, APTA PARA SU USO

5 FARMACEUTICO

RESUMEN

La presente invención describe una formulación inmunogénica para ser utilizada en
10 mamíferos contra Metapneumovirus humano (hMPV) consistente en un liofilizado de
1x10⁹ ufc/ml de BCG recombinantes que expresa la proteína viral P de hMPV (de los
genogrupos A1, A2, B1 y B2). La vacuna esta derivada del producto completo o parcial del
gen P de hMPV pudiendo ser utilizadas, estabilizadas y administradas en solución sin la
necesidad de adyuvantes. La preparación puede contener además combinaciones de
15 formulaciones descritas anteriormente. La formulación está estabilizada por liofilización
(rango de conservación entre 4°C y 8°C), para ser posteriormente reconstituida en una
solución salina sin adyuvante previo a su uso.

Figura 1

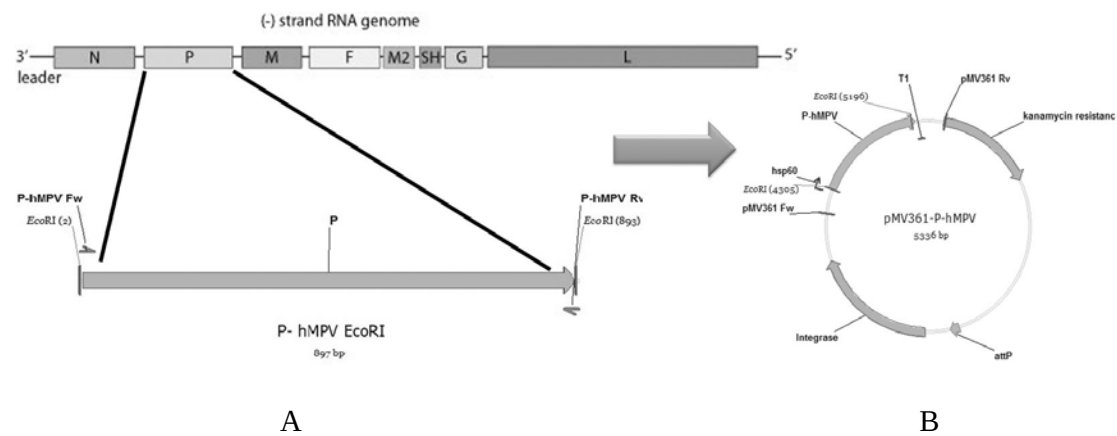


Figura 2

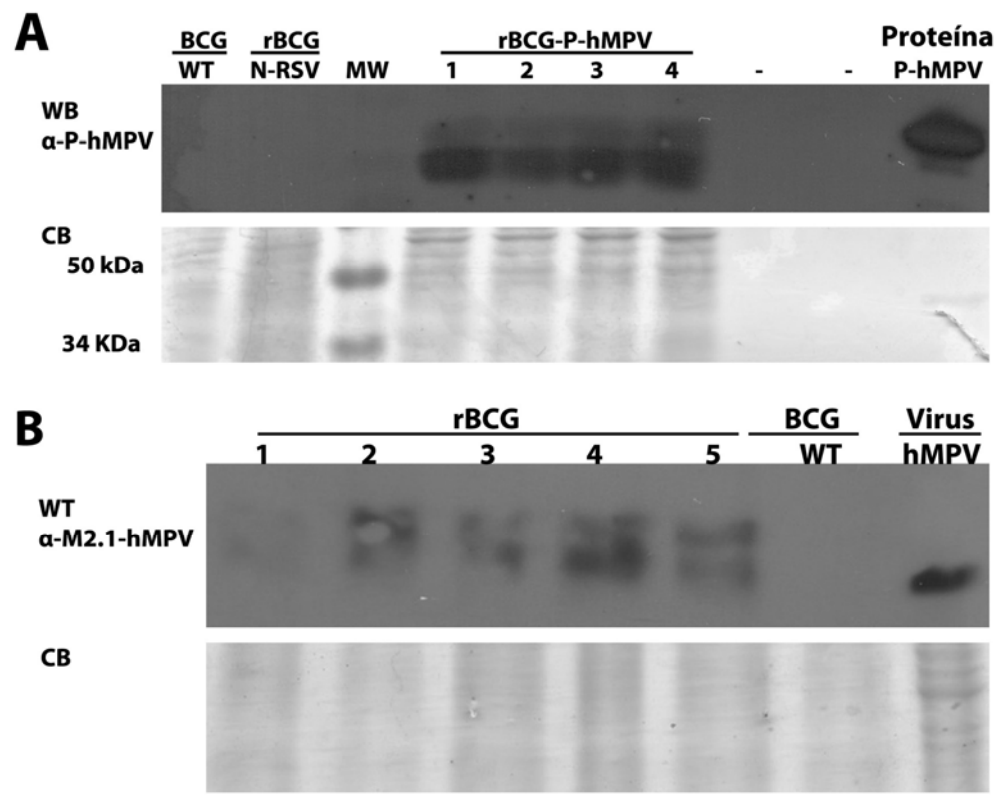


Figura 3

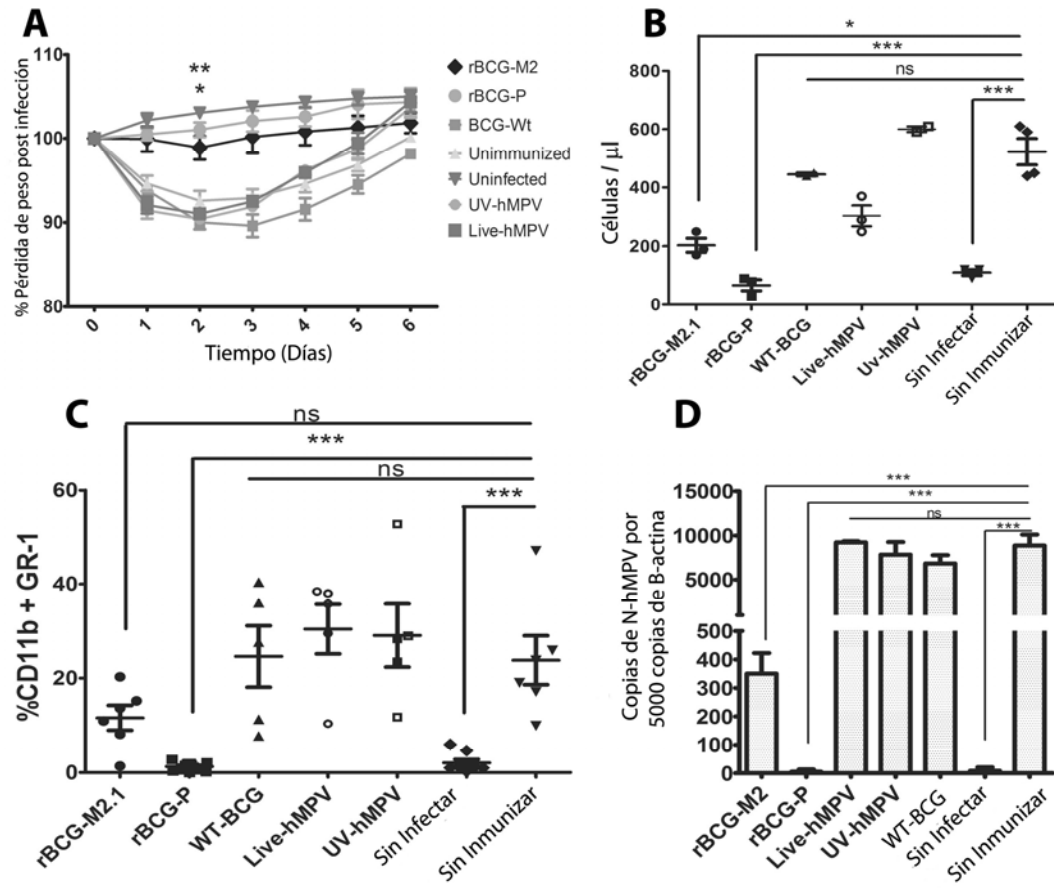
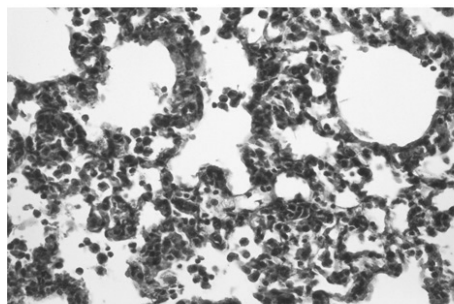
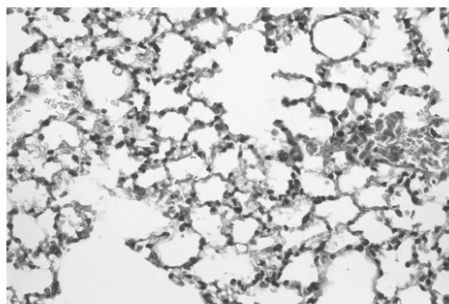


Figura 4

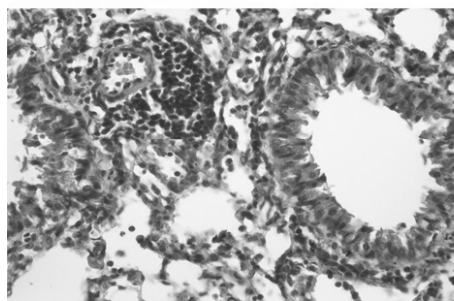
rBCG-M2.1



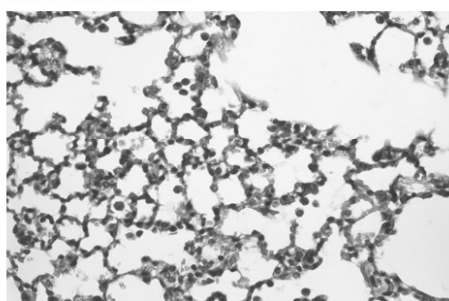
rBCG-P



Sin Inmunizar



Sin Infectar



WT-BCG

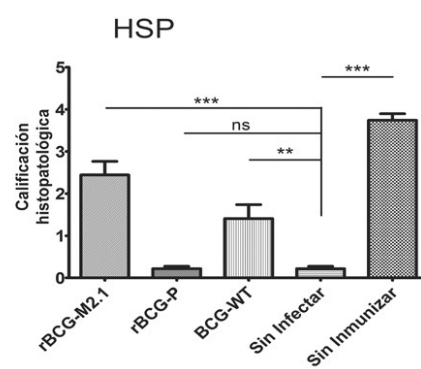
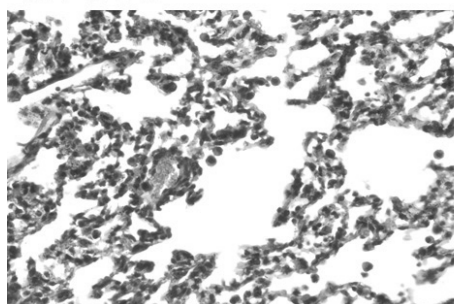


Figura 5

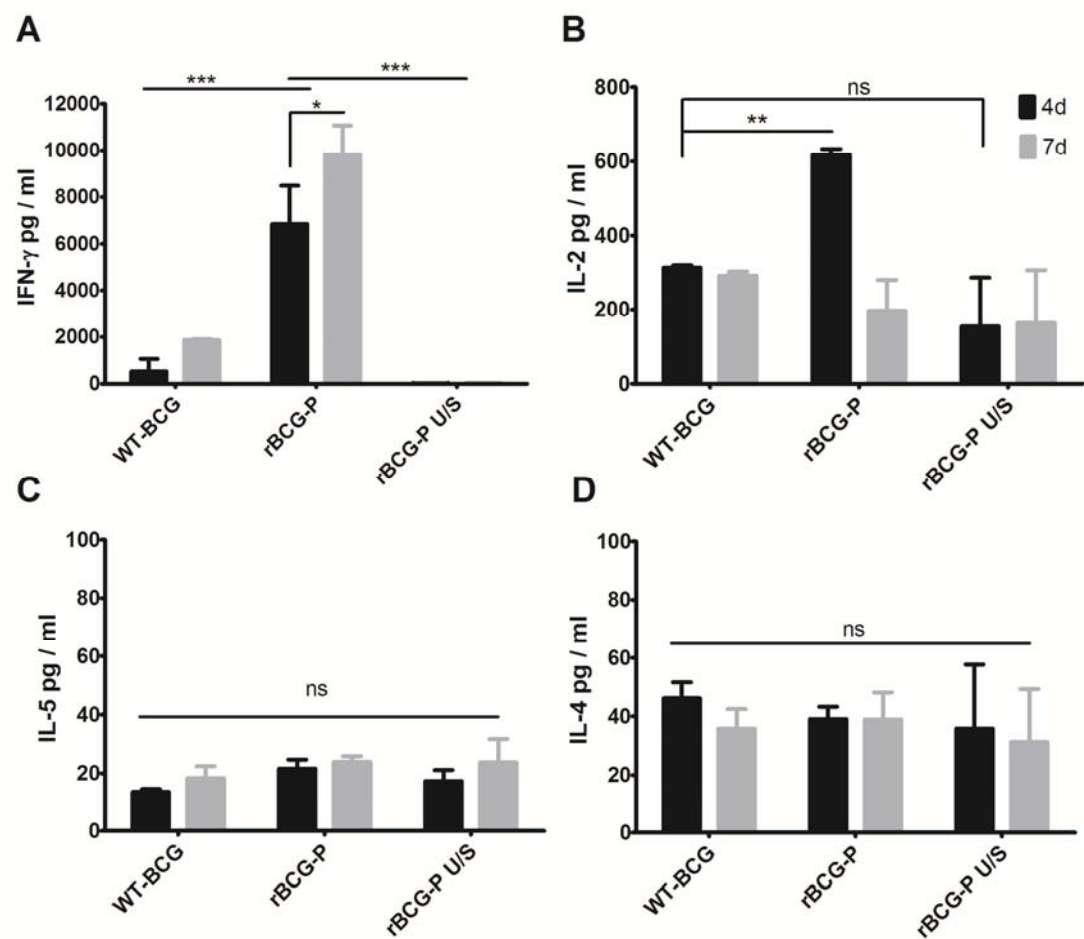


Figura 6

