

FUNDAMENTO

[01] Citomegalovirus es un género viral de la familia viral conocida como Herpesviridae o herpesvirus. Normalmente se abrevia como CMV. La especie que infecta a los humanos se conoce comúnmente como CMV humano (HCMV) o herpesvirus-5 humano (HHV-5), y es el más estudiado de todos los citomegalovirus. Alrededor del 60% de la población adulta y en algunos países ya se alcanza el 100% de infección endémica. La infección suele ser asintomática en pacientes inmunocompetentes, aunque a veces se puede producir una enfermedad similar a la mononucleosis. La infección conduce al establecimiento de la latencia de toda la vida, que de vez en cuando puede estar interrumpida por la reactivación. Sin embargo, para los sujetos inmunodeficientes, como los pacientes con cáncer o trasplantes, neonatos o pacientes con VIH una infección por CMV puede ser una amenaza seria, incluso dando lugar a la mortalidad. El CMV puede persistir en el hospedero debido a que el genoma viral codifica múltiples proteínas que interfieren con la presentación de antígenos virales del CMH de clase I. Una proteína viral bloquea la translocación de péptidos en el lumen del retículo endoplásmico, mientras que otras dos proteínas virales causan la degradación de las proteínas del CMH de clase I antes de que alcancen la superficie de la célula.

[02] Los tratamientos actuales aplican agentes antivirales tales como el ganciclovir, foscarnet, aciclovir, cidofovir o leflunomida. Mientras que estos agentes pueden ser adecuados para los pacientes de trasplantes y pacientes inmunocomprometidos, no pueden ser utilizados para las mujeres embarazadas. Para éstas se prefiere una terapia con hiperinmunoglobulinemia. Aunque varios intentos se han hecho en el estado de la técnica para llegar a una vacuna tal como una vacuna viva atenuada, una vacuna contra la proteína de la subunidad, una vacuna que codifica un vector de la subunidad viral, hasta ahora, ninguna vacuna está disponible todavía.

[03] El citomegalovirus (CMV) es uno de los más grandes y complejos de los virus conocidos que causan enfermedades humanas. El genoma de 235 kb codifica al menos 165 proteínas, pero la investigación de vacunas de CMV se ha centrado en un número limitado de proteínas virales que dominan la respuesta inmune celular o humoral durante la infección natural. La proteína pp65 es un objetivo importante de la respuesta de células T citotóxicas.

Situada dentro del tegumento entre la cápside y la envoltura viral, pp65 es la proteína más abundante en los viriones de CMV. La proteína IE1 es también un objetivo importante de las células T citotóxicas que no está presente en el virión, pero se expresa abundantemente en las células después de la infección. En la superficie del virión y se incluyen varios complejos de glicoproteína que median la entrada en la célula hospedera. Se cree que un heterodímero compuesto de la glicoproteína M y de la glicoproteína N inicia la interacción con la célula hospedera mediante la unión a heparina. Un segundo heterodímero compuesto de la glicoproteína H y de la glicoproteína L (gH/gL) puede mediar las interacciones con el receptor que culminan en la activación de cambios conformacionales en la glicoproteína B (gB) que lleva a la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula diana. Un complejo pentamérico de CMV compuesto por gH, gL, UL128, UL130, UL131A media la entrada en las células epiteliales y endoteliales. Todos estos complejos son objetivos importantes para la inmunidad humoral, ya que contienen epítopes que se unen una selecta clase de anticuerpos conocidos como anticuerpos neutralizantes. El objetivo general en el desarrollo de una vacuna es inducir una actividad neutralizante tanto contra infección por CMV de células epiteliales/endoteliales y fibroblastos.

[04] Una variedad de enfoques de vacunas están bajo estudio, incluyendo péptidos simples o subunidades; complejos de múltiples subunidades recombinantes como gH/gL o el complejo pentamérico completo; los viriones de CMV inactivados que contienen al complejo pentamérico nativo, gB, pp65, y otros antígenos virales; CMVs genéticamente discapacitados que expresan el complejo pentamérico nativo, que combina potencialmente la inmunogenicidad de una vacuna viva con la seguridad de una vacuna muerta; los vectores virales de replicación defectuosa (por ejemplo, viruela, adenovirus, alfavirus, y otros) que expresan subunidades o complejos de múltiples subunidades; y combinaciones de sensibilización/refuerzo de los anteriores.

[05] Una vacuna candidata atractiva es el complejo pentamérico de CMV que media la entrada en las células epiteliales y endoteliales. Sin embargo, el grado en que los epítopes conformacionales y/o las múltiples subunidades dependientes dominan el "epítome neutralizante" del complejo pentamérico sigue siendo poco claro. La necesidad posible de representar el complejo pentamérico completa en su estado de conformación nativa es sugerido por un estudio de anticuerpos monoclonales aislados de pacientes infectados de forma natural: de 17 anticuerpos neutralizantes específicos de complejo pentamérico, todos menos 1 epítopo reconocido dependiente de múltiples subunidades.

[06] Mientras que muchos intentos de proporcionar el complejo pentamérico de CMV, en particular HCMV se hicieron en arte previo, para el mejor conocimiento de los presentes inventores, hasta ahora el complejo pentamérico no podría proporcionarse en forma estable y en cantidades suficientes, mientras que idealmente podría tener una alta pureza. Sin embargo, para la provisión de una vacuna de un complejo pentamérico estable en cantidades suficientes con alta pureza que sea inmunogénico para inducir una respuesta inmune se necesita. El problema técnico que subyace en la presente invención es, pues, satisfacer esta necesidad.

[07] La presente invención resuelve este problema proporcionando nuevos medios y métodos para producir el complejo pentamérico de CMV. Es, en particular, basado en el sorprendente hallazgo de que el complejo pentamérico se puede expresar de forma estable con un alto rendimiento utilizando un vector de baculovirus en una célula hospedera adecuada, incluyendo células de insecto. Además, los presentes inventores han encontrado inesperadamente que el complejo pentamérico obtenido por los métodos de la invención es particularmente útil como un producto farmacéutico y/o composición de vacuna. Esto era claramente imprevisto, porque las proteínas recombinantes producidas en las células de insecto difieren de sus contrapartes "naturales" con respecto a su patrón de glicosilación -un parámetro importante que modula la respuesta inmune. Además, los presentes inventores han, en la primera vez, logrado proporcionar un complejo pentamérico estable de CMV producido en un sistema de expresión, particularmente en un sistema de baculovirus, que permite la producción a gran escala de complejos pentaméricos altamente puros e inmunogénicos.

RESUMEN

[008] Los presentes inventores han sido pioneros en el establecimiento de nuevos medios y métodos, que permiten la producción del complejo pentamérico de CMV en forma estable y con un alto rendimiento y pureza. Por primera vez, los presentes inventores han expresado los componentes proteicos del complejo pentamérico de CMV utilizando un vector de baculovirus en altas cantidades y observado el montaje de un complejo pentamérico funcional.

[009] Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo pentamérico compuesto por proteínas de CMV UL128, UL130, UL131A, gH(UL75) y gL(UL115) que es obtenible mediante el método, que comprende

- (i) la co-expresión de UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115) en una célula hospedera mediante el uso de baculovirus;
- (ii) purificar el complejo pentamérico de las células hospederas y/o el sobrenadante obtenido a partir de dicha co-expresión; y
- (iii) almacenar opcionalmente el complejo pentamérico purificado en una solución tampón que comprende un agente quelante y / o un agente estabilizante.

[010] La célula hospedera puede ser una célula de insecto o célula de mamífero

[011] Las líneas celulares de producción preferidas de esta invención son líneas celulares de insecto tales como Sf9, Sf21, Super Sf9-1 (VE-1), Super Sf9-2 (VE-2), Super Sf9-3 (VE-3), Hi- 5, Mimic Sf9, Vankyrin, Express Sf +, y células S2 Schneider, prefiriéndose Super Sf9-2 [Oxford Expresión Technologies, Cat. No. 600103 y Fath-Goodin et al. (2006), Adv. Virus Res. 68, 75-90; Kroemer et al. (2006), J. Virol. 80 (24), 12.291 a 12.228 y US20060134743. Las células Super Sf-9 están diseñadas para expresar de forma estable la proteína los P-Vank-1 de Camoletis sonorensis ichtnovirus. Para la expresión en células de mamífero, en particular células humanas, por ejemplo, se utilizan células HEK293, HEK293F, CHO, HeLa, HUVEC, HUAEC, Huh7, HepG2, BHK, MT-2, Cos-7, Cos-1, C127, 3T3, fibroblastos de prepucio humano (HFF), fibroblastos de médula ósea, melanoma de Bowes, células neuronales primarias o células epiteliales,

[012] La etapa de co-expresión puede incluir infectar células hospederas con un baculovirus que expresan dichas proteínas y que tiene un título de aproximadamente 10^7 pfu/ml o superior

al infectar dicha célula hospedera que tiene un recuento de células en la infección de alrededor de 2×10^6 células/ml; cultivar dichas células hospederas en condiciones adecuadas, y la cosecha de dichas células hospederas y/o del sobrenadante entre 56-65 h después de la infección.

[013] Las células hospederas, en particular, las células de insecto, pueden ser infectadas entre el día 15 y día 50, preferiblemente entre 15 días y 30 días, preferiblemente al día 18 después de la descongelación y el cultivo.

[014] La purificación puede incluir la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de afinidad.

[015] El agente quelante puede ser EDTA o EGTA. Preferiblemente, el EDTA está presente en dicha solución tampón a una concentración de 20 mM o menos, tal como 3 mM o menos.

[016] El agente estabilizante puede ser polietilenglicol, arginina, glicina, sorbitol, trehalosa, glicerol, sacarosa, glucosa, DMSO, OTMA y/o NP-40.

[017] Además, la solución tampón puede comprender tampón Tris, NaCl, $MgCl_2$, y / o KCl.

[018] Los marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican las proteínas UL128, UL130, UL131A, gH y gL de CMV pueden estar en uno o más vectores, preferiblemente en un solo vector.

[019] El vector puede contener elementos para la propagación en bacterias (*E. coli*), levadura (*S. cerevisiae*), células de insectos y / o células de mamífero.

[020] Los ORFs se pueden localizar en el siguiente orden de 5' a 3' en el que dicho vector:

(Yo) gH, gL, UL128, UL130, UL131;

o (ii) gL, UL128, UL130, UL131, gH.

[021] Preferiblemente,

(A) en (i) el ORF de gH se transcribe en dirección 3', el ORF de gL se transcribe en dirección 5', el ORF de UL128 se transcribe en dirección 3', el ORF de UL130 se transcribe en dirección 3', y el ORF de UL131A se transcribe en dirección 3';

(B) en (i) el ORF de gH se transcribe en dirección 3', el ORF de gL se transcribe en dirección 3', el el ORF de UL128 se transcribe en dirección 3', el ORF de UL130 se transcribe en dirección 3', y el ORF de UL131A se transcribe en dirección 3';

(C) en (ii) el ORF de gL se transcribe en dirección 5', el ORF de UL128 se transcribe en dirección 3', el ORF de UL130 se transcribe en dirección 3', el ORF de UL131A ORF se transcribe en dirección 3', y el ORF de gH se transcribe en dirección 3'.

[022] Cada una de dichos ORFs pueden ser conducidos por el promotor p10, el promotor polh, IE-1, el promotor mCMV, promotor VP39, promotor lef2, el promotor CAG, promotor HepB SV40 o cualquier otro promotor descrito en el presente documento y seguido por una secuencia terminadora como terminador HSVtk o un terminador SV40 o cualquier otro terminador descrito en este documento.

[023] Al menos una de dichas proteínas pueden comprender una etiqueta, que puede ser una etiqueta de His, Strep-Etiqueta, un His-Strep-Etiqueta, StrepII-Etiqueta, SofEtiqueta 1, TC-Etiqueta, myc-Etiqueta, FLAG-Etiqueta, HA-Etiqueta, V5-Etiqueta, Avi-Etiqueta, calmodulina-Etiqueta, poliglutamato-Etiqueta, beta-amiloide-Etiqueta, etiqueta de GST, MBP-Etiqueta o S-Etiqueta. Preferiblemente, la proteína gH está equipada con una His-Etiqueta, que comprende preferiblemente 8 residuos His.

[024] Uno o más de dichas proteínas puede comprender proteasa PreScission o PreScission y la proteasa TEV, preferiblemente la proteína gH y/o la proteína gL comprenden proteasa PreScission o PreScission y la proteasa TEV.

[025] La actividad v-cath y/o chía de los genes de baculovirus pueden estar funcionalmente interrumpidas.

[026] El complejo pentamérico de la invención también puede estar en la forma de una composición.

[027] El complejo pentamérico de la invención también puede ser capaz de inducir la actividad de neutralización que inhibe tanto la infección de células epiteliales/endoteliales (Epi/CE) y la infección de fibroblastos.

[028] En un segundo aspecto, la presente invención también proporciona un método para la producción de un complejo pentamérico compuesto de proteínas UL128, UL130, UL131A,

gH (UL75) y gL (UL115) de CMV que comprende (i) la co-expresión de proteínas UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115) CMV de baculovirus en una célula hospedera; (ii) purificar el complejo pentamérico de las células hospederas y/o del sobrenadante obtenido a partir de dicha co-expresión; y (iii) almacenar opcionalmente el complejo pentamérico purificado en una solución tampón que comprende un agente quelante y/o un agente estabilizante.

[029] En un tercer aspecto, una composición farmacéutica o composición de vacuna que comprende un complejo pentamérico de la invención u obtenible por el método de la invención y opcionalmente un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable se proporciona.

[030] En un cuarto aspecto, en el complejo pentamérico de la invención, al menos uno, dos, tres o cuatro de dichas proteínas se pueden derivar de una cepa de CMV distinta de la cepa de CMV de la que se derivan las proteínas restantes.

Las proteínas de CMV se pueden derivar de la cepa CMV Towne, Towne que tiene el genoma como se depositó en el NCBI GenBank bajo el número de acceso FJ616285.1, Toledo (GU937742.1), AD169 (FJ527563), Merlin (AY446894.2), TB20 / E (KF297339.1), VR1814 (GU179289). El aa Y en la posición 204 se intercambió por el aa F, de acuerdo con Patrone et al., J. Virol., 2005, 79, 8361-8373 el principal problema de la expresión de UL130 es el marco de lectura en la misma posición que conduce a una expansión de aminoácidos al siguiente ORF. En un quinto aspecto, la invención proporciona una cepa modificada de CMV Towne que tiene el genoma como se depositó en el NCBI GenBank bajo el número de acceso FJ616285.1 y que tiene en la posición 204 de la secuencia de aminoácidos del ORF UL130 los aminoácidos F, así como la reparación de desplazamiento del marco en la misma posición de la cepa de laboratorio Towne (cultivados en fibroblastos de prepucio humanos) que resulta en un ácido amino funcional Y.

[031] Debe tenerse en cuenta que, como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el", incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas equivalentes y

métodos conocidos por los expertos normales en la técnica que podrían ser modificadas o sustituidas para los métodos descritos en este documento.

[032] A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse para referirse a todos los elementos en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes están destinados a ser abarcados por la presente invención.

[033] El término "y/o" donde se utiliza aquí incluye el significado de "y", "o" y "todo o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

[034] El término "cerca de" o "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria significa dentro de 20%, preferiblemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo dado. Incluye, sin embargo, también el número concreto, por ejemplo, aproximadamente 20 incluye 20.

[035] El término "menor que" o "mayor que" incluye el número concreto. Por ejemplo, menor a 20 significa menos que o igual a. Del mismo modo, más que o mayor que significa más que o igual a, o mayor que o igual a, respectivamente.

[036] A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o etapas o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo del número entero o etapa. Cuando se usa aquí, el término "que comprende" puede ser sustituido por el término "contiene" o "incluyendo" o, a veces, cuando se utiliza aquí con el término "tiene".

[037] Cuando se usa aquí "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reclamación. Cuando se usa aquí, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o medidas que no afecten materialmente las características básicas y nuevas de la reclamación.

[038] En cada instancia en la presente memoria cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede sustituir con cualquiera de los otros dos términos.

[039] Se debe entender que esta invención no está limitada a las metodologías, protocolos, materiales, reactivos y sustancias particulares, etc., que se describen en este documento y como tal puede variar. La terminología utilizada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

[040] Todas las publicaciones y patentes citadas en el texto de esta especificación (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, las especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), incluso supra o infra, se incorporan para referencia en su totalidad. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de la invención anterior. En la medida en que el material incorporado por referencia contradiga o sea incompatible con esta especificación, la especificación sustituirá a dicho material.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[041] *Figura 1: Representaciones esquemáticas de los vectores recombinantes para la expresión de complejos pentaméricos de CMV y proteínas solubles de CMV.*

Las diferentes variantes se insertan en el esqueleto del vector pRBT136 dirigido a la expresión de proteína recombinante usando el sistema de expresión de baculovirus (BEVS) y que contiene dos promotores P1 y P2 ($\triangleleft$ _p10, $\triangleright$ _polh) y dos secuencias de terminación T1 y T2 (T), que son SV40 y HSVtk. Para la propagación en levaduras los vectores contienen un origen de replicación (O), por ejemplo, 2micron, y un gen marcador (m), por ejemplo URA3. Además, los vectores contienen los sitios de transposón izquierdo (TL) y derecha (TR) de la transposición de los transgenes desde el vector de transferencia en bácmidos, un sitio loxP (L) para el sitio específico de recombinación homóloga (plásmido de fusión), orígenes de replicación (O), genes de resistencia ampicilina (A), cloranfenicol (C) y gentamicina (G), y sitios de restricción definidos. Para la expresión en células de mamíferos, ya sea por transducción con un baculovirus o la expresión transitoria, la columna vertebral del vector pRBT 393 contiene además un promotor seleccionado de pCMV, IE1 y lef2, y un terminador seleccionado de SV40pA, BHG pA y HSVtk.

Abreviaturas: c: secuencia de consenso; H: His-Etiqueta; SH: estreptavidina-His-Etiqueta ; V: cepa VR1814, PCI: proteasa precision, PCII: proteasa precision y TEV, DT: Herramienta de dimerización, T: terminador, O: origen de replicación, G: resistencia a la gentamicina, C: resistencia a cloranfenicol, L: sitio loxP, TL: lado izquierdo del transposón, TR: lado derecho del transposón.

[042] Figura 2: *Análisis del proceso de purificación que consiste en etapas de cromatografía de afinidad, seguido de cromatografía de exclusión de tamaño del complejo pentamérico CMV etiquetado con His soluble.*

El complejo pentamérico comprende las proteínas de superficie UL75 (His-etiquetados, gH) - UL115 (gL) -UL128-UL130-UL131A (SEQ ID NO: 18) se purificó mediante una cromatografía basada en afinidad (IMAC) utilizando columnas His-Trap, seguido mediante cromatografía de exclusión por tamaño (XK16 / 60 Superdex200pg).

(A) La segunda purificación IMAC se analizó mediante SDS-PAGE (4-12% de gel Bis-Tris) seguido por tinción de Coomassie-. Los tamaños (kDa) del patrón de proteínas (carril 1) están marcados en el lado izquierdo. Carril 2: grupo de la primera IMAC (carga del segundo proceso de IMAC), carril 3: flujo a través, carril 4: lavado, los carriles 5-14 representan las fracciones de elución con el aumento de la concentración de imidazol hasta 500 mM.

(B) Análisis de purificación de cromatografía de exclusión por tamaño por SDS-PAGE (4-12% Bis-Tris gel) seguido por tinción de Coomassie-. Los tamaños (kDa) del patrón de proteínas (carril 1) están marcados en el lado izquierdo. Carril 1: de elución IV-2, precipitado; carril 2: de elución IV-2, no precipitada; carril 3: combinación de elución IV-3; carril 4: elución V; carril 5: de elución VI; carril 6: marcador de tamaño. Se indican con una flecha las proteínas del complejo pentamérico (gH, gL, UL128, UL130, UL131A).

(C) inmunotransferencia usando el anticuerpo contra la His-tag de gH. El carril 1 representa el grupo de elución IV-2 (precipitado); carril 2: elución IV-2 (no precipitada); carril 3: combinación de elución IV-3; carril 4: elución V; carril 5: de elución VI; carril 6: control positivo. La proteína gH-His-etiquetada está marcada en el lado derecho.

(D) Tinción de Coomassie de SDS-PAGE (4-12% Bis-Tris gel) de purificada, soluble CMV (HCMV) complejo pentamérico humana (SEQ ID NO: 18) (carril 6). Para la determinación de la concentración de proteína por análisis densitométrico se cargaron diferentes cantidades de

BSA (carril 2: 0,1 mg / mL carril 3: 0,2 mg / mL; carril 4: 0,3 mg / mL; carril 5: 0,5 mg / mL). Los tamaños (kDa) del patrón de proteínas (carril 1) están marcados en el lado izquierdo.

(E) El complejo pentamérico que comprende las proteínas de superficie UL75 (marcada con His, gH) -UL115 (gL) -UL128-UL130-UL131A (SEQ ID NO: 18) se purificó mediante una cromatografía de afinidad basada en un paso (IMAC) utilizando una columna cargada Ni_2^+ (escala depende del tamaño del granel), seguido de concentración en un dispositivo centrífugo Macrosep PALL y la diálisis frente a tampón de almacenamiento que contiene (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM de KCl, pH 6,5, 0,2% de Brij-35) El complejo soluble purificado se analizó mediante SDS-PAGE (4-12% Bis-Tris gel) seguido por tinción de Coomassie y un análisis densitométrico junto a diferentes cantidades de BSA (carril 2: 0,1 mg / mL carril 3: 0,2 mg / mL; carril 4: 0,3 mg / mL; carril 5: 0,5 mg / mL; carril 6: complejo pentamérico purificado). Los tamaños (kDa) del patrón de proteínas (carril 1) están marcados en el lado izquierdo.

[043] Figura 3: *Ensayo de neutralización para verificar la respuesta inmune humoral basado en la SEQ ID NO: 18*

Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes de los donantes de sangre CMV humanos y sueros de ratón. El suero de cinco donantes de sangre HCMV positivos (grupo G2, D6-D10) y cinco negativos (Grupo G1, D1-D5) en una dilución en serie de dos veces (1:20 a 1: 2560) se sometieron a un ensayo de neutralización de fluorescencia basado en células. Se muestra la dilución de suero (sd) que dio el mismo efecto inhibitorio como 1: 320: dilución de los sueros combinados obtenidos a partir de ocho ratones previamente inmunizados con el complejo pentamérico (18 SEQ ID NO). El análisis por separado del complejo pentamérico soluble, como un componente en la mezcla de antígeno utilizado para la inmunización de los ratones, mostró la inducción de anticuerpos neutralizantes en comparación con los donantes humanos de sangre.

PR: pentámero pre-inmune, PO: pentámero post-inmune, G1: donantes de sangre negativos, G2: donantes de sangre positivos.

[044] **Figura 4:** *Control de calidad del complejo soluble, SEQ ID NO: 18, como candidato a vacuna.*

Las fracciones eluidas con diferentes cantidades de imidazol se muestran después de ser sometidas a una purificación basada en IMAC. Ellos pusieron a prueba la presencia de UL75 (GH) y de la His en GH. La similitud en la intensidad de la señal designa la integridad de gH y por lo tanto de todo el complejo compuesto por UL75-UL115-UL128-UL30-UL131A.

1: carga, 2: flujo a través, 3: lavado, 4: imidazol 250 mM, 5-8: imidazol 300 mM, 9-13: imidazol 350 mM, 14: control positivo, 15: control negativo

[045] **Figura 5:** *Control de calidad del complejo soluble, SEQ ID NO: 18, como candidato a vacuna utilizando anticuerpos dependientes de la conformación.*

Diferentes lotes de producción del complejo se ensayaron con un ensayo ELISA sándwich para evaluar la co-presencia de las proteínas designadas. Las muestras fueron capturadas con un anticuerpo anti-GH1 (UL75) y se detectaron con un anticuerpo anti-UL130 (UL130 / UL131A) dependiente de la conformación anti-gH2 y un anti-His, así como anti-UL130 / 131A y. Las señales confirman la co-existencia de las proteínas en un complejo, lo intacto del complejo, así como la reproducibilidad de su producción.

1: lote 451-grupo 1, 2: lote 459-grupo 2, 3: lote 459-grupo 1 (EDTA 15 mM), 4: lote 459-grupo 1 (EDTA 20 mM), 5: 458 lotes EDTA (15 mM), 6: control positivo, 7: control negativo, 8: patrón interno

[046] **Figura 6:** *Secuencias de aminoácidos de referencia para las proteínas gH, gL, UL128, UL130 y UL131A de CMV.*

gH (SEQ ID NO: 1), gL (SEQ ID NO: 2), UL128 (SEQ ID NO: 3), UL130 (SEQ ID NO: 4), UL131A (SEQ ID NO: 5)

[047] **Figura 7:** *Visión general cualitativa de la respuesta inmune celular basada en la SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 67*

[048] (A) Comparación de la secreción de citoquinas que muestran respuesta Th-1 y Th-2 dependiente en el antígeno que se utiliza para la inmunización de ratones. (B, C, D) Los

esplenocitos fueron re-estimulados con un lisado de virus AD169 mientras que la secreción de citoquinas fue verificada mediante un ensayo multiplex de acuerdo con el protocolo del fabricante. El adyuvante llevó a un aumento de la secreción de IL-4 mientras que no tuvo un efecto estimulador de la secreción de IFN-gamma o IL-5. La secreción de citoquinas depende de la dosis del el complejo pentamérico; la dosis más baja fue beneficiosa.

P1: Complejo pentamérico (cepa Towne); P2: complejo pentamérico (cepa Towne y VR1814); adj: adyuvante; VLP: partículas similares a virus; GB: glucoproteína soluble gB (UL55); BV: baculovirus

[049] Figura 8: Ensayo de neutralización para verificar la respuesta inmune humoral basado en las SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 67

Comparación de los títulos de anticuerpos neutralizantes de los donantes de sangre de CMV humanos y sueros de ratón. El suero de cinco donantes de sangre HCMV positivos (seropositivos) y cinco negativos (seronegativos) en una dilución en serie de dos veces (1:20 a 1: 2560) se sometieron a un ensayo de neutralización de fluorescencia basado en células. La dilución de suero (sd) que dio el mismo efecto inhibitorio como una dilución 1: 100 de mezcla de sueros obtenidos a partir de cuatro de ocho ratones previamente inmunizados con el complejo pentamérico (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 67) en combinación con VLP, se muestra gB y adyuvante. El análisis por separado del complejo pentamérico soluble, como un componente en la mezcla de antígeno utilizado para la inmunización de ratones, mostró la inducción de anticuerpos neutralizantes en comparación con los donantes humanos de sangre seropositivos y seronegativos.

La neutralización de fibroblastos (MRC-5) y células epiteliales (ARPE-19) se investigó con dos cepas diferentes de virus, la cepa VR1814 y TB40E.

P1: Complejo pentamérico (cepa Towne); P2: complejo pentamérico (cepa Towne y VR1814); adj: adyuvante; VLP: partículas similares a virus; GB: glucoproteína soluble gB (UL55); BV: baculovirus; preinmune: antes de la inmunización; inmune: después de la inmunización

[050] Figura 9: Visión general de la producción de pentámero para verificar la estabilidad del proceso basado en SEQ ID NO: 18.

Descripción general de varios lotes de producción utilizando diferentes virus de producción con parámetros un poco diferentes para verificar la estabilidad del proceso de producción.

[051] Figura 10: Análisis del proceso de purificación que consiste en cromatografía de afinidad por etapas de, y cromatografía de intercambio de iones del complejo pentamérico - CMV soluble etiquetado-His.

SDS-PAGE (NuPAGE Invitrogen) teñido con azul de Coomassie (SimplyBlue, Invitrogen) de CMV humano complejo pentamérico soluble (HCMV) (E0713 lote, carril 6 y E0714 lote, carril 7) se utilizó para el análisis densitométrico (software ImageJ) de la pureza y la concentración. Las tres bandas observadas en la Fig. 1 representan gH-His, así como las proteínas co-migrar gL/UL130 y UL128/UL131A (todos identificados en lotes anteriores mediante espectrometría de masas). La suma de las tres bandas se comparó con un estándar de BSA (análisis densitométrico; software ImageJ) y dio lugar a una pureza de ~ 97 a ~ 98% (ver Figura 9) Y un complejo pentamérico hCMV de concentración de 0,30 a 0,34 mg / mL. Para la determinación de la concentración de proteína por análisis densitométrico se cargaron diferentes cantidades de BSA (carril 2: 0,2 mg / mL; carril 3: 0,4 mg / mL; carril 4: 0,6 mg / mL). La concentración de complejo pentamérico HCMV en las muestras finales (carriles 6 y 7) es 0,30 mg / mL y 0,34mg / mL, respectivamente, para E0713 y E0714. * MM: Precisión Plus Protein TM todos los patrones del azul (Bio-Rad, # 161-0373, carril 1).

[052] Figura 11: Caracterización del complejo pentamérico purificada basado en la SEQ ID NO: 18.

La identidad del producto, al final del proceso de DSP (IMAC-AEX-IMAC), se confirmó a través de un ELISA directo. El complejo se verificó con un anticuerpo α -gH (Santa Cruz, sc-58113) y un anticuerpo α -His (ABD Serotec, MCA1396) y se detectó con un anticuerpo α -ratón-HRP (Cell Signaling, 7076S). Las señales confirman la co-existencia de gH y de la etiqueta y, por tanto, apuntan a la integridad del complejo pentamérico HCMV soluble. El control negativo (neg.ctrl.) Refleja que una muestra de baculovirus carece de los genes de interés.

[053] Figura 12: Resumen de los datos de control de calidad después de la producción y purificación de complejo pentamérico basado en SEQ ID NO: 18.

Resumen de los datos de control de calidad para verificar la integridad del complejo pentamérico después de la purificación, así como de las impurezas restantes en lo que se refiere a las células hospederas utilizadas y su sistema de expresión.

[054] Figura 13: Influencia de agentes estabilizantes en lo que respecta al rendimiento del complejo pentamérico basado en SEQ ID NO: 18.

Verificación de la estabilidad del complejo pentamérico en lo que respecta a buffer, pH y la estabilización de reactivos tales como EDTA. Después de la purificación con diálisis con diversos tampones basados en ensayos anteriores se realizaron ensayos termofluor para verificar la influencia de agentes estabilizantes en combinación con diferentes tampones y pH. Para la determinación de la concentración de proteína por análisis densitométrico se cargaron diferentes cantidades de BSA (carril 1: 0,2 mg / mL; carril 2: 0,4 mg / mL; carril 3: 0,6 mg / mL). El complejo pentamérico HCMV en el sobrenadante y el sedimento después de la diálisis con diferentes tampones se muestra. Lane5: PBS, EDTA 20 mM, pH 6,0 (sobrenadante); carril 6: PBS, EDTA 20 mM, pH 6,0 (pellet); carril 7: Tris, 20 mM EDTA, pH 7,4 (sobrenadante); carril 8: Tris, 20 mM EDTA, pH 7,4 (pellet); carril 9: Tris, 20 mM EDTA, pH 6,0 (sobrenadante); carril 10: Tris, 20 mM EDTA, pH 6,0 (pellet); * MM: Precisión Plus Protein TM todos los estándares de color azul (Bio-Rad, # 161-0373, carril 4).

(B, C) Validación de diversas cantidades de EDTA durante la diálisis. El uso de EDTA 10 mM mostró claramente que la mitad ca. del producto se perdió por precipitación (pellet), el aumento de cantidad de EDTA estabilizó al complejo. (B) complejo pentamérico con baja cantidad de EDTA, carril 2: Tris, 10 mM EDTA, pH 7,4 (sobrenadante); carril 3: Tris, 10 mM EDTA, pH 7,4 (pellet); (C) Para la determinación de la concentración de proteína por análisis densitométrico se cargaron diferentes cantidades de BSA (carril 1: 0,2 mg / mL; carril 2: 0,4 mg / mL; carril 3: 0,6 mg / mL). El complejo pentamérico HCMV en el sobrenadante y el sedimento después de la diálisis con diferentes tampones se muestra. Lane5: Tris, 20 mM EDTA, pH 7,4 (sobrenadante); carril 6: Tris, 20 mM EDTA, pH 7,4 (pellet); carril 7: Tris, 15 mM EDTA, pH 7,4 (sobrenadante); carril 8: Tris, 15 mM EDTA, pH 7,4 (pellet); carril 9: Tris, 25 mM EDTA, pH 6,0 (pellet); carril 10: Tris, 25 mM EDTA, pH 6,0 (sobrenadante); * MM: Precisión Plus Protein TM todos los patrones de azul (Bio-Rad, # 161-0373, carril 4). El tampón con un efecto mínimo de precipitación para la etapa de primera diálisis parece ser Tris, EDTA 20 mM, pH 7,4.

Figura 14: Horario del estudio in vivo

Se realizó un estudio adicional in vivo para verificar los efectos de las dosis, variantes de complejos pentaméricos y combinaciones con diversas proteínas de CMV ya sea con o sin un adyuvante

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[055] Existe una necesidad continua de identificar antígenos potentes de CMV que provocan respuestas inmunes protectoras, neutralizando las al CMV, y para desarrollar vacunas de CMV que logran niveles altos de protección. El complejo pentamérico gH / gL / UL128 / UL130 / UL131A de CMV es una herramienta prometedora para el desarrollo de vacunas nuevas de CMV. Sin embargo, la producción a gran escala del complejo pentamérico se ha visto obstaculizada por los sistemas ineficientes de expresión de proteínas. Los presentes inventores han, por primera vez, utilizado un sistema de baculovirus para co-expresar los componentes de la proteína, e informaron que un complejo pentamérico funcional se ensambló lo que podría provocar una respuesta inmunogénica *in vivo*.

[056] Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un complejo pentamérico compuesto por proteínas de CMV UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115) que es obtenible mediante el método, que comprende

- (i) co-expresión de proteínas CMV UL128, UL130, UL131a, GH (UL75) y gL (UL115) en una célula hospedera mediante el uso de baculovirus;
- (ii) purificar el complejo pentamérico de células y /o sobrenadante obtenido a partir de dicha co-expresión; y
- (iii) almacenar opcionalmente el complejo pentamérico purificado en una solución tampón que comprende un agente quelante y/o un agente estabilizante.

[057] El término "CMV" se refiere a Citomegalovirus, un género viral del herpesvirus o virus del herpes. En general, el término abarca todas las especies de CMV, incluyendo, entre otras cosas, el citomegalovirus humano (HCMV), que también se conoce como herpesvirus

humano 5 (HHV-5), Chimpancé citomegalovirus (CCMV), citomegalovirus Simian (SCCMV) y citomegalovirus Rhesus (RhCMV). Preferiblemente, el CMV de acuerdo con la presente invención es HCMV. Un gran número de cepas de HCMV son conocidas, incluyendo pero no limitado a TR, Towne, AD 169, Toledo, Merlin, TB40, Davis, etc.

[058] Típicamente, CMV comprende al menos 5 proteínas de la cápside (productos génicos de UL46, UL48A, UL85, UL86, UL104), 19 proteínas reguladoras, 17 proteínas de tegumento (productos génicos de UL25, UL45, UL47, UL48, UL69, UL71, UL72, UL76, UL77, UL83 [pp65], UL88, UL93, UL94, UL95, UL97, UL99, UL103), 5 proteínas de la superficie o de la envoltura (productos génicos de UL55 [gB], UL73 [gN], UL74 [gO], UL75 [gH], UL100 [gM], UL115 [gL]), los productos no categorizados de los genes del marco abierto de lectura de UL128, UL130, UL131A; proteínas de 15 genes beta-herpesvirus específicos (UL23, UL24, UL32, UL33, UL35, UL36, UL38, UL43, UL74 [GO], UL78, UL82, UL96, IRS1, US22, TRS1) y las llamadas proteínas funcionales de los marcos abiertos de lectura (ORF) de UL50, UL80.5.

[059] El término "complejo pentamérico" o en su forma corta como también se utiliza en el presente documento "complejo" se refiere a un complejo de proteínas que comprende las cinco proteínas CMV UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115) que se cree facilita la entrada del virus en las células diana, en particular, células endoteliales, epiteliales y fibroblastos. Un modelo del complejo pentamérico y sus interacciones proteína-proteína ha sido propuesto por Ryckmann BJ et al. J Virol. 2008; 82 (1): 60-70. En el complejo pentamérico de la invención, gH, gL y pUL128 se cree que están típicamente unidos a través de enlaces disulfuro, y UL130 y UL131A se incorporan típicamente en el complejo pentamérico (y/o relacionados entre sí) por interacciones no covalentes. La estequiometría de los complejos pentaméricos se supone que es 1: 1: 1: 1: 1 (Ryckmann BJ et al J Virol 2008; 82 (1):.. 60-70). Se prefiere que el complejo pentamérico de la invención es capaz de provocar anticuerpos in vivo que inmunológicamente reaccionan de forma cruzada con un virión de CMV. El complejo pentamérico es preferiblemente soluble. Sin embargo, también puede estar unido a la membrana, aunque esto es menos preferido. La solubilidad se consigue preferiblemente mediante la supresión del dominio transmembrana de gH. El término "compuesto de" cuando se utiliza en el contexto del complejo pentamérico de la presente invención significa que el complejo pentamérico abarca/comprende las cinco proteínas gH, gL, UL128, UL130 y UL131A como se describe en el presente documento y, puede, además, abarcar otras proteínas de CMV. Sin embargo, el complejo pentamérico preferiblemente,

contiene sólo las cinco proteínas de CMV, gH, gL, UL128, UL130 y UL131A. El complejo pentamérico de la presente invención puede estar en la forma de una composición. En consecuencia, se añaden uno o más agentes adicionales mezclados con el complejo pentamérico, resultando así en una composición. Tales agentes adicionales se describen en el presente documento, por ejemplo, un tampón, agente quelante y/o un agente estabilizante. Las composiciones adecuadas se describen adicionalmente en este documento.

[060] En el complejo pentamérico de la invención, una o más de las proteínas puede comprender epítopes de B y / o de células T adicionales. Dicho epítope de células T puede ser un epítope de células T CD4 o un epítope de células T CD8. Preferiblemente, dicho epítope es uno cualquiera de los epítopes que se muestran en las SEQ ID NOs: 22-66.

[061] Un "epítope" es la parte de un antígeno que es reconocida por el sistema inmune, por ejemplo, Células B o células T. El término abarca tanto epítopes conformacionales y lineales (o secuenciales). Los epítopes conformacionales comprenden secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno, mientras que los epítopes lineales se componen de una sección continua de la secuencia de aminoácidos del antígeno. El término incluye además cryptotopes y neotopes. Los "Cryptotopes" son epítopes que están ocultos en el antígeno de origen natural, por ejemplo, un virus, pero pueden llegar a ser accesibles cuando el antígeno no está presente en su conformación natural. Los "Neotopes" son epítopes que se encuentran sólo en las estructuras cuaternarias de las proteínas, pero no en monómeros de proteína.

[062] Se prevé que los epítopes adicionales pueden estar fusionados a la secuencia de aminoácidos de uno o más componentes de la proteína del complejo pentamérico. La fusión de secuencias de aminoácidos del componente(s) de proteína deseado del complejo de la invención se pueden conseguir por métodos estándar de la ingeniería genética bien conocidos por la persona experta en la técnica.

[063] De acuerdo con la presente invención, el epítope puede ser un epítope de una célula B y/o de células T.

[064] Los epítopes de células B es una región de un antígeno (por ejemplo, una proteína nativa) reconocido por cualquiera de un receptor particular unido a la membrana de células B (BCR) o un anticuerpo. Un número de métodos están fácilmente disponibles para identificar o seleccionar epítopes de células B, incluyendo la cristalografía de rayos x, exploración de oligopéptido basada en matrices, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de mapeo, y de

presentación de fagos, así como métodos computacionales tal como fue revisado por Sun et al. Comput Métodos matemáticos Med. 2013; 2013: 943636. Por ejemplo, los métodos adecuados incluyen modelos de predicción basados en la estructura, que se basan en la estructura 3D del antígeno y escalas de propensión relacionados con epítopes, incluyendo atributos geométricos y propiedades fisicoquímicas específicas. Basado en la estructura algoritmos y los servidores web (programas) incluyen, por ejemplo, EPSVR y EPMeta (<http://sysbio.unl.edu/services/>), EPCES (<http://sysbio.unl.edu/services/EPCES/>), Y Epitopia (<http://epitopia.tau.ac.il/>). Métodos de predicción basados en Mimotopo son métodos combinatorios que requieren ambos péptidos de afinidad-seleccionada de anticuerpos y la estructura 3D del antígeno como entrada. Algoritmos y programas ejemplares basados en modelos de predicción basados en mimotopo incluyen, por ejemplo, MimoPro (<http://informatics.nenu.edu.cn/MimoPro>), PepSurf (<http://pepitope.tau.ac.il>) y EpiSearch (<http://curie.utmb.edu/episearch.html>). Además, los modelos de predicción basados en la secuencia que están disponibles sólo se basan en la secuencia primaria de un antígeno, por ejemplo, BEST y el método de Zhang como revisado en Sun et al. Comput Métodos matemáticos Med. 2013; 2013: 943636. Además, los sitios de los modelos de predicción se pueden utilizar con métodos vinculantes que infieren que se centran en los sitios de unión de predicción de la interacción proteína-proteína de la interacción de un antígeno y un anticuerpo, por ejemplo, ProMate, ConSurf, PINUP, y PIER.

[065] Sin desear estar vinculado por una teoría específica, se prevé que la presencia de uno o más epítopes de células B en el complejo de la invención tiene preferiblemente un efecto inmunoestimulador sobre las células B por ejemplo, lo que resulta en la activación y / o diferenciación de la célula B y provoca una respuesta inmunogénica, que puede, por ejemplo resultar en la generación de anticuerpos neutralizantes. Las células B pueden ser probadas con diferentes métodos de acuerdo con protocolos estándar conocidos en la técnica para determinar el potencial inmunoestimulante de un epítope. Ensayos adecuados de ensayos de linfoproliferación, la detección de marcadores de activación inducidos en las células T específicas, ELIspot, tinción de citocinas intracitoplasmáticas (ICS), y secreción de citoquinas.

[066] Los epítopes de células T se derivan típicamente de antígenos de proteínas procesados. En el contexto de la presente invención, el epítope de células T puede ser un epítope de células CD4-T o un epítope de células T CD8. Mientras que las células T citotóxicas (CD8) reconocen péptidos intracelulares mostrados por moléculas del CMH de clase I (epítopes de

células T CD8), células auxiliares T reconocen péptidos que se toman desde el espacio extracelular y se muestran por moléculas CMH de clase II (CD4 de células T epítopes). El complejo péptido:CMH (pMHC) interactúa con el receptor de células T, que conduce a su activación y la posterior inducción de una respuesta inmune celular.

[067] Un número de métodos in silico para la predicción y / o selección epítope de células T están disponibles. Para T CD8 + predicción epítope de células, NetCTL-1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>), EpiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/epijen/EpiJen/EpiJen.htm>), o MAPPP (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/>), se puede utilizar, tal como fue revisado en Larsen et al. BMC Bioinformatics 2007, 8: 424. Para las células T CD4 +, los modelos computacionales para la predicción epítope han sido revisados por Oyarzún P et al. BMC Bioinformatics 2013, 14:52 e incluyen métodos basados en datos que se basan en la comparación de secuencias de péptidos para identificar motivos de unión, por ejemplo, Rankpep (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>), TEPITOPE, y NN-align (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NNAlign/>), así como los métodos basados en la estructura en la que realizan cálculos de modelización molecular a fin de estimar las energías de enlace, ofreciendo así la independencia de los datos de unión experimentales, por ejemplo, NetMHCIIPan-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIPan-2.0/>), TEPITOPEpan (<http://www.biokdd.fudan.edu.cn/Service/TEPITOPEpan/>) y Predivac (<http://predivac.biosci.uq.edu.au/>).

[068] Sin desear estar vinculado por una teoría específica, se prevé que la presencia de uno o más epítopes de células T en el complejo de la invención tiene preferiblemente un efecto inmunoestimulador en las células T, por ejemplo, lo que resulta en la activación y/o diferenciación de la célula T y preferiblemente provoca una respuesta inmunogénica. Los métodos adecuados para determinar el potencial inmunoestimulante de un epítope en células T incluyen ensayos de multímeros de CMH péptido, los ensayos de complejos en fase sólida de MHC-péptido, ensayos de linfoproliferación, la detección de marcadores de activación inducida en las células T específicas, ELIsot, tinción de citocinas intracitoplasmáticas (ICS), Secreción de citoquinas y Captura en la superficie celular (CSC), y la secreción de citoquinas y captura de superficie en pozo (Cell-ELISA), tal como fue revisado en Li Pira G et al. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010: 325.720.

[069] En la alternativa al complejo pentamérico como se describe en el presente documento, también se prevé que otros complejos de CMV son producidos por los medios y métodos de la presente invención y por lo tanto se aplican en los aspectos y realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, se prevé que se produce un complejo compuesto por dos, tres o cuatro de gH, gL, UL128, UL130 y UL131A. Un ejemplo preferido de un complejo dimérico es un complejo entre gH y gL o UL130 y UL131A. Otro ejemplo preferido de una alternativa al complejo pentamérico es un complejo trimérico entre gH / gL / gO. Por lo tanto, todos los aspectos y formas de realización descritas en el presente documento en relación con el complejo pentamérico son plenamente aplicables a los complejos diméricos o triméricos descritos antes, *mutatis mutandis*. También se prevé que otros complejos de CMV descritos en este documento pueden comprender epítopes de células B y/o T adicionales. Dicho epítipo de células T puede ser un epítipo de células T CD4 o un epítipo de células T CD8 tal como se describe en el presente documento.

[070] Los complejos de la invención son preferiblemente preparados y utilizados en forma aislada. El término "aislado", como se usa aquí significa retirado de su entorno natural. Por lo tanto, un "complejo pentamérico aislado" o "complejo aislado" preferiblemente no abarca el complejo de proteína de membrana CMV en la superficie de las células infectadas por CMV o dentro de un virión infeccioso de CMV.

[071] El término "gH" cuando se usa en el presente documento a veces puede ser referido como "UL75" o "pUL75". Cada uno de estos términos puede sustituir al otro y, por lo tanto, estos términos se utilizan indistintamente. El término "gH" abarca polipéptidos gH que tienen mutaciones en relación con la secuencia de referencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y también abarca polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte un cierto grado de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 Como se describe aquí. También abarcado por dicho término los fragmentos de polipéptidos gH que tienen una longitud de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, o 700 aminoácidos, con lo que dichos fragmentos son preferiblemente capaces de formar un complejo pentamérico con las otras cuatro proteínas como se describe aquí. Un polipéptido gH preferido carece del dominio transmembrana (TM). La ausencia de un dominio TM significa que este polipéptido modificado no puede residir dentro de una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, el polipéptido gH carece del dominio TM natural, de longitud completa; en otras realizaciones, puede retener una porción del dominio natural de TM, pero no lo suficiente para dejar que la proteína resida en una bicapa lipídica. Así, el polipéptido

puede contener hasta 10 amino ácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) del dominio gH TM natural. Además de carecer de algunas o de la totalidad del dominio TM, el polipéptido también puede carecer del dominio natural de C-terminal de gH de CMV o puede carecer de una porción del dominio C-terminal.

[072] El ectodominio de gH corresponde a la porción de gH que carece del dominio transmembrana hidrofóbico (TM). La ubicación y la longitud del ectodominio, la secuencia señal y el dominio TM se pueden predecir en base al análisis computacional de la hidrofobicidad a lo largo de la longitud de una secuencia de la proteína gH dada. La secuencia señal y el dominio TM tienen los más altos niveles de hidrofobicidad y estas dos regiones flanquean el ectodominio, que es menos hidrófobo.

[073] El término "gL" cuando se usa en el presente documento a veces puede ser referido como "UL115" o "pUL115". Cada uno de estos términos puede sustituir al otro y, por lo tanto, estos términos se utilizan indistintamente. El término "gL" abarca polipéptidos gL que tienen mutaciones en relación con la secuencia de referencia que se muestra en la SEQ ID NO: 2 y abarca también polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte un cierto grado de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 Como se describe aquí. También abarcado por dicho término son los fragmentos de polipéptidos gL que tienen una longitud de 50, 100, 150, 200, o 250 aminoácidos. por lo que dichos fragmentos son preferiblemente capaces de formar un complejo pentamérico con las otras cuatro proteínas como se describe aquí.

[074] El término "UL128" cuando se usa en el presente documento a veces puede ser referido como "pUL128". Cada uno de estos términos puede sustituir al otro y, por lo tanto, estos términos se utilizan indistintamente. El término "UL128" abarca polipéptidos UL128 que tienen mutaciones en relación con la secuencia de referencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3 y también abarca polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte un cierto grado de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 Como se describe aquí. También abarcado por dicho término son los fragmentos de polipéptidos UL128 que tienen una longitud de 50, 100, o 150 aminoácidos con lo cual dichos fragmentos son preferiblemente capaces de formar un complejo pentamérico con las otras cuatro proteínas como se describe aquí.

[075] El término "UL130" cuando se usa en el presente documento a veces puede ser denominado "pUL130", o "UL130A". Cada uno de estos términos puede sustituir al otro y,

por lo tanto, estos términos se utilizan indistintamente. El término "UL130" abarca polipéptidos UL130 que tienen mutaciones en relación con la secuencia de referencia se muestra en la SEQ ID NO: 4 y también abarca polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte un cierto grado de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 Como se describe aquí. También abarcado por dicho término se encuentran fragmentos de polipéptidos UL130 que tienen una longitud de 50, 100, 150, o 200 aminoácidos con lo cual dichos fragmentos son preferiblemente capaces de formar un complejo pentamérico con las otras cuatro proteínas como se describe aquí.

[076] El término "UL131A" cuando se usa en el presente documento a veces puede ser denominado "pUL131A", "UL131" o "pUL131". Cada uno de estos términos puede sustituir al otro y, por lo tanto, estos términos se utilizan indistintamente. El término "UL131a" abarca polipéptidos UL131A que tienen mutaciones en relación con la secuencia de referencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5 y también abarca polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte un cierto grado de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 Como se describe aquí. También abarcado por dicho término se encuentran los fragmentos de polipéptidos UL131A que tienen una longitud de 50, o 100 aminoácidos con lo cual dichos fragmentos son preferiblemente capaces de formar un complejo pentamérico con las otras cuatro proteínas como se describe aquí.

[077] Como se ha indicado cada proteína de la invención, en particular, gH, GL, UL128, UL130 y UL131A, respectivamente, o un fragmento de las mismas, puede contener mutaciones, tales como inserciones, deleciones y sustituciones en relación con las secuencias de referencia que se muestran en las SEQ ID NO: 1 (gH), SEQ ID NO: 2 (gL), SEQ ID NO: 3 (UL128), SEQ ID NO: 4 (UL130), y SEQ ID NO: 5 (UL131A), respectivamente, siempre y cuando estas mutaciones no sean perjudiciales para el uso de las proteínas como antígenos, en particular, siempre que conservan uno o más epítopes que pueden provocar la producción de anticuerpos que pueden unirse a al menos un complejo pentamérico y / o anticuerpos que pueden neutralizar los efectos biológicos de dicho complejo pentamérico. Además, dichas mutaciones no deberían impedir la capacidad de las proteínas para formar un complejo pentamérico de la invención. La capacidad para formar un complejo pentamérico de la invención se puede probar mediante la realización de la purificación de proteínas, y el análisis de las proteínas por ejemplo, PAGE no reductores, Western blot y/o cromatografía de exclusión por tamaño. En particular, cada proteína puede comprender una etiqueta que, por ejemplo, pueden facilitar la detección, purificación y/o mejorar la solubilidad. Ejemplos de

etiquetas que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen un His-Tag, un Strep-Tag, un Su-Strep-tag, un StrepII-Tag, un Softag 1, un TC-tag, un myc-Tag, una FLAG-tag, un HA-tag, un V5-tag, un Avi-tag, una calmodulina-tag, un poliglutamato-tag, una etiqueta beta-amiloide, una etiqueta de GST, un MBP-tag o una S-tag, siendo preferido el His-Tag. El His-tag puede estar compuesto de 6 o 8 residuos de His, siendo preferidos 8 residuos de His. Las proteínas también se pueden truncar y / o transformar en su forma madura, por ejemplo, las proteínas pueden carecer de secuencias de señal presentes en su forma nativa y/o en los dominios transmembrana.

[078] Como se ha dicho, las proteínas gH o fragmentos de las mismas de la invención pueden tener diversos grados de identidad con la SEQ ID NO: 1 tal como al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 1. Las proteínas preferidas gH: (I) pueden dimerizar con CMV gL; (Ii) forma parte del complejo trimérico gH / gL / gO; (Iii) forma parte del complejo pentamérico gH / gL / UL128 / UL130 / UL131A; (Iv) carecer de un dominio transmembrana; y/o (iv) pueden provocar anticuerpos in vivo que inmunológicamente reaccionan de forma cruzada con un virión de CMV.

[079] Como se ha dicho, las proteínas gL o fragmentos de las mismas de la invención pueden tener diversos grados de identidad con la SEQ ID NO: 2 tal como al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 2. Las proteínas preferidas gL: (i) se pueden dimerizar con gH de CMV; (Ii) forma parte del complejo trimérico gH / gL / gO; (Iii) Forma parte del complejo pentamérico gH / gL / UL128 / UL130 / UL131A; y/o (iv) puede provocar anticuerpos in vivo que inmunológicamente reaccionan de forma cruzada con un virión de CMV.

[080] Como se ha dicho, las proteínas UL128 o fragmentos de las mismas de la invención pueden tener diversos grados de identidad con la SEQ ID NO: 3 tal como al menos 60%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 3. Las proteínas preferidas UL128: (i) pueden formar parte de la pentamérico complejo gH / gL / UL128 / UL130 / UL131A, y / o (ii) pueden provocar anticuerpos in vivo que inmunológicamente reaccionan de forma cruzada con un virión de CMV.

[081] Como se ha dicho, las proteínas UL130 o fragmentos de las mismas de la invención pueden tener diversos grados de identidad con la SEQ ID NO: 4 tal como ser al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 4. Las proteínas preferidas pUL130: (i) pueden formar un complejo pentamérico gH /gL / UL128 / UL130 / UL131; y/o (ii) pueden provocar anticuerpos in vivo que inmunológicamente reaccionan de forma cruzada con un virión de CMV.

[082] Como se ha dicho, las proteínas UL131A o fragmentos de las mismas de la invención pueden tener diversos grados de identidad con la SEQ ID NO: 5 tal como al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 5. Las proteínas preferidas UL131A: (i) pueden formar complejos pentaméricos gH / gL / pUL128 / pUL130 / pUL131A, y / o (ii) pueden provocar anticuerpos in vivo que inmunológicamente reaccionan de forma cruzada con un virión de CMV.

[083] "Identidad de secuencia" o "% de identidad" se refiere al porcentaje de coincidencias de residuos entre al menos dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos alineados utilizando un algoritmo estandarizado. Dicho algoritmo puede insertar, de una manera estandarizada y reproducible, las lagunas en las secuencias que se comparan con el fin de optimizar la alineación entre dos secuencias, y por lo tanto lograr una comparación más significativa de las dos secuencias. Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se determina utilizando el programa BLAST versión 2.2.29 NCBI (Jan-06-2014) (Altschul et al, Nucleic Acids Res (1997) 25.: 3389-3402). La identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar con el conjunto de blastp en los siguientes parámetros: Matriz: BLOSUM62, Word Tamaño: 3; Esperar valor: 10; Costo Gap: Existencia = 11, Extensión = 1; Filtro = baja complejidad activa; Filtra Cadena: L; Ajustes de composición: ajuste de matriz de puntuación de composición condicional. Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa BLAST versión 2.2.29 NCBI (Jan-06-2014) con blastn fijado en los siguientes parámetros ejemplares: Palabra Tamaño: 11; Esperar valor: 10; Costos Gap: Existence = 5, Extensión = 2; Filtro = baja complejidad activa; Coincidencia / Discrepancia Puntuaciones: 2, -3; Filtra Cadena: L; m.

[084] Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente. El término "polipéptido" se refiere a una proteína o péptido que contiene dos o más aminoácidos, típicamente al menos 3, preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 30, tal como al menos 50 aminoácidos. Por consiguiente, un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos, y, por lo tanto, a veces un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos se denomina aquí como un "polipéptido que comprende una secuencia de polipéptido". Por lo tanto, en el presente documento el término "secuencia de polipéptido" es intercambiable se utiliza con el término "secuencia de aminoácidos".

[085] El término "aminoácido" o "aa" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintético, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina sulfonio metilo. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

[086] La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas y/o fragmentos de gH, gL, UL128, UL130, UL131A como se describe en el presente documento. Estas moléculas de ácido nucleico son, por ejemplo, utilizadas a la hora de expresar una o más de dichas proteínas o se utilizan como moléculas de ácido nucleico como tales, por ejemplo, para la vacunación. Para el propósito de expresar una o más de dichas proteínas, que se clonan en un vector tal como se conoce comúnmente y se describe aquí.

Paso de Co-expresión

[087] "Co-expresión" es el término utilizado para una o más proteínas del CMV expresadas en una célula hospedera, preferiblemente una célula de insecto o célula de mamífero,

mediante el uso de baculovirus, por ejemplo, un sistema de expresión de baculovirus o sistema de expresión BacMam. Un "vector de expresión" se define aquí como vehículo utilizado para transferir material genético a una célula hospedera diana, donde el material genético se puede expresar. Se prevé, en particular, que las proteínas de CMV se expresan en un sistema de expresión de baculovirus. Un "sistema de expresión" es la combinación de un vector de expresión, y la célula hospedera para el vector que proporcionan un contexto para permitir la expresión del gen extraño en la célula hospedera.

[088] El complejo de la presente invención puede ser expresado transitoriamente o establemente.

[089] Los baculovirus son virus de ADN de doble cadena en forma de barra que se encuentran principalmente en los insectos.

[090] El sistema de expresión de baculovirus se basa típicamente en la introducción de un gen extraño en una región no esencial del genoma viral, por ejemplo, a través de recombinación homóloga con un vector de transferencia que contiene un gen diana. Los baculovirus recombinantes resultantes pueden carecer de uno de los genes no esenciales (por ejemplo polh, v-cath, la chía) sustituido con un gen extraño que codifica la proteína heteróloga que se puede expresar en una célula hospedera adecuada. Estas técnicas son generalmente conocidos para los expertos en la técnica y han sido revisados por ejemplo, por Kosta et al. Nat Biotechnol. 2005; 23 (5): 567-75. Un enfoque específico para la preparación de vectores de baculovirus recombinantes es el sistema Bac-to-Bac baculovirus (Invitrogen).

[091] El vector de expresión de baculovirus recombinante de la invención es preferentemente capaz de replicarse en una célula hospedera y, opcionalmente, en una célula procariota tal como E. coli. Según la presente invención, puede usarse cualquier vector de expresión de baculovirus derivado de un baculovirus comúnmente usado para la expresión recombinante de proteínas. Por ejemplo, el vector de baculovirus se puede derivar de, por ejemplo, AcMNPV, Bombyx mori (Bm) NPV, Helicoverpa armigera (Hear) NPV o Spodoptera exigua (Se) MNPV. El vector de baculovirus puede ser un bácmido.

[092] Es un perjuicio común en la técnica anterior que la expresión de proteínas de CMV en células de mamífero era preferible porque se sabía que las proteínas de CMV producidas tendrían auténticos patrones de glicosilación de mamíferos, y por tanto, estarían dotadas de epítopes que están presentes en el CMV infeccioso. Por consiguiente, se esperaba, que sólo

tales proteínas serían, cuando se utiliza para la inmunización, permitieran la generación de anticuerpos que son capaces de unirse a partículas de origen natural de CMV durante la infección

[093] Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que los complejos pentaméricos inmunogénicos se pueden obtener usando vectores de baculovirus no sólo a partir de células de mamífero, sino también a partir de células de insectos. Al mismo tiempo, utilizando el sistema de baculovirus que permite la producción del complejo pentamérico de la invención en grandes cantidades y con alta pureza. Preferiblemente, el complejo pentamérico producido con la ayuda de los medios y métodos de la invención exhibe un patrón de glicosilación específico, es decir, insecto-glicosilación (véase Harrison y Jarvis (2006), Adv. Virus Res. 68, 159-191) que hace único y por lo tanto diferente de una glicosilación de mamífero.

[094] Por lo tanto, la célula hospedera puede en general ser una célula de insecto o célula de mamífero. En general, cualquier célula hospedera que es preferiblemente adecuada para expresar moléculas de ácido nucleico para producir el complejo pentamérico de la invención puede ser utilizada. La célula hospedera utilizada de acuerdo con la invención puede ser en particular una célula de insecto, preferentemente Sf9, Sf21, Super Sf9-1 (VE-1), Super Sf9-2 (VE-2), el Super Sf9-3 (VE-3), Hi-5, células Express Sf + y S2 Schneider, siendo preferidos Super Sf-9-2 [Oxford Expresión Technologies, Cat. No. 600103, Oxford, Reino Unido; Fath-Goodin et al. (2006), Adv. Virus Res. 68, 75-90; Kroemer et al. (2006), J. Virol. 80 (24), 12.291 a 12.228 y US20060134743.]. Las células hospederas ejemplares de mamífero adecuados para uso de acuerdo con la presente invención son conocidas en la técnica e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero no se limitan a, HEK293, HEK293F, CHO, HeLa, HUVEC, HUAEC, Huh7, HepG2, BHK, MT-2, Cos-7, Cos-1, C127, 3T3, fibroblastos de prepucio humano (HFF), fibroblastos de médula ósea, melanoma de Bowes, células neuronales primarias, o células epiteliales. Expresión en células de mamífero puede provocar que las proteínas producidas tengan auténticos patrones de glicosilación de mamíferos, y por lo tanto posean epítopes que están presentes en las partículas infecciosas de CMV. Por lo tanto, sin pretender imponer ninguna teoría, la producción de complejos pentaméricos de la invención en células de mamífero dará lugar a la producción de anticuerpos que son capaces de unirse a partículas de origen natural de CMV durante la infección. Sin embargo, ya que los presentes inventores observaron que el complejo pentamérico cuando se produce en células de insecto

induce la neutralización de la actividad, particularmente anticuerpos neutralizantes con idealmente bloqueo o al menos disminución de la entrada de CMV en células epiteliales/endoteliales y fibroblastos.

[095] Sin embargo, y tal como se establece en el presente documento, la célula hospedera también puede ser una célula de mamífero. Por ejemplo, en el sistema de BacMam, los vectores de expresión de baculovirus son utilizados para entregar genes a las células de mamífero.

[096] Los presentes inventores han descubierto inesperadamente parámetros específicos que permiten, por ejemplo, la producción de un alto rendimiento de los complejos pentaméricos de la invención. Por ejemplo, el complejo pentamérico de la invención puede acumularse hasta un nivel de más de 1,0 mg por litro de medio de crecimiento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 200, 300, 400, 500, 600, 650, 680, 700, 800, 900, 1000) mg por litro de medio de crecimiento o más).

[097] De acuerdo con lo anterior, se prevé que la etapa de co-expresión implica infectar las células huésped con un baculovirus que expresa las proteínas del complejo pentamérico de la invención. Se prevé además que el baculovirus tiene un título de aproximadamente 10^7 pfu / ml o superior al infectar dicha célula hospedera, que tiene preferiblemente un recuento celular de aproximadamente 2×10^6 células / ml a la infección.

[098] Entonces, las células hospederas se cultivan en condiciones adecuadas. Preferiblemente, después de 56-65 h de la infección posterior, las células hospederas y / o su sobrenadante se cosechan. En la alternativa, las células hospederas y / o su sobrenadante se cosechan cuando al menos 80% (en relación con un total de 100%) de las células hospederas son viables. La viabilidad de las células hospederas puede, por ejemplo, determinarse tiñendo las células con azul de tripano. Las células viables no son de color, mientras que se colorearán las células no viables. La tinción con azul de tripano se puede realizar como sigue: 1 ml de suspensión celular está sujeta a un 0,4% de tinte azul de tripano durante unos 5 minutos, seguido de la observación microscópica por preferiblemente usando un hemocitómetro con el fin de determinar el porcentaje de células viables / no viables en relación con todas las células contadas (es decir, todas células contadas se ajustan para que sea 100%).

[099] "Cosecha" en todas sus formas gramaticales significa el acto o proceso de obtención de las células hospederas y / o el sobrenadante, y puede, por ejemplo, incluir tripsinización,

filtración y/o centrifugación. Cualquier método es concebible siempre y cuando los complejos pentaméricos de la invención se puedan obtener en su forma intacta o funcional.

[0100] Se prevé además que, en los métodos de la presente invención, las células hospederas se infectan entre el día 15 y día 50, preferiblemente entre 15 días y 30 días, preferiblemente al día 18 después de la descongelación y cultivo.

[0101] En algunas realizaciones, el complejo pentamérico de la invención se secreta de las células en las que se expresa. En otras realizaciones de la invención, el complejo pentamérico de la invención no se secreta. Es una realización preferida que ninguna de las proteínas del complejo pentamérico contiene una señal de secreción adicional. Sin estar ligado por la teoría, se supone que una vez que el complejo pentamérico ensambla en una célula hospedera, en particular en una célula de insecto, la proteína gH media la secreción de todo el complejo.

Purificación

[0102] La "Purificación" en todas sus formas gramaticales significa la eliminación de compuestos indeseables, por ejemplo, células, restos de células, medio de cultivo, de baculovirus, ya sea baculovirus intactas o no intactos, etc. métodos de purificación adecuados, dependiendo del sistema de expresión, rendimiento, etc. son fácilmente disponibles en la técnica anterior. Por ejemplo, la purificación puede incluir la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño y / o cromatografía de afinidad, todos los cuales han sido ampliamente descritos antes. Como se ha dicho, la etapa de purificación incluye, entre otras cosas, la eliminación de baculovirus. Tales baculovirus pueden estar contenidos en el medio y / o sobrenadante del cultivo que se puede obtener a partir de células hospedera que fueron infectadas con un vector de baculovirus o BacMam vectorial. Se prefiere que tales baculovirus ser retirados cuando la purificación de un complejo pentamérico de la presente invención. Los presentes inventores encontraron que en cromatografía de intercambio iónico en particular, más particularmente cromatografía de intercambio aniónico se puede aplicar para eliminar baculovirus del medio de cultivo y / o sobrenadante obtenible a partir de una célula hospedera como se describe aquí.

[0103] La Purificación como se usa en el presente documento también incluye que las células hospederas que co-expresan las proteínas CMV UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115) pueden ser retiradas del medio de cultivo. Dicho medio de cultivo comprende preferiblemente un complejo pentamérico de la presente invención, ya que dichas células

hospederas preferiblemente secretan dicho complejo pentamérico. La Extracción de células hospederas del medio de cultivo se pueden hacer por fuerza mecánica, tal como por centrifugación o por filtración. La filtración se realiza preferiblemente mediante el uso de un medio de filtración, tales como filtros de microfiltración o en filtros de profundidad. Los filtros de microfiltración pueden estar compuestas de poliétersulfona o celulosa regenerada. Los filtros de profundidad pueden estar compuestos de fibras de polipropileno o de vidrio.

[0104] Sin embargo, también se prevé que dicha célula hospedera no tiene necesariamente que secretar dicho complejo pentamérico. Si es así, a continuación, dichas células hospederas pueden ser cosechadas. Después de la cosecha, dichas células hospederas pueden ser lisadas, por ejemplo, enzimáticamente o mecánicamente con el fin de liberar un complejo pentamérico que puede entonces ser purificado como se describe aquí.

[0105] Después de la purificación, se prefiere que un agente quelante tal como EDTA o EGTA se añada al complejo. Preferiblemente EDTA está presente a una concentración final de 20 mM. Posteriormente, se prefiere que la concentración final de EDTA de 20mM se reduzca por diálisis a 3 mM como concentración final o inferior tal como se describe en el presente documento.

Almacenamiento

[0106] "Almacenamiento" en todas sus formas gramaticales significa preservar (para uso futuro), preferiblemente en condiciones que mantienen el complejo pentamérico de la invención en su forma intacta o funcional, es decir, el complejo pentamérico se asemeja preferiblemente su forma de origen natural y/o es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes. Por tanto, se prevé que las condiciones de almacenamiento no promueven (o siquiera impiden) la desintegración del complejo pentamérico de la invención. El término "desintegración" ha de entenderse en su sentido más amplio en el presente documento y puede significar "desmontaje" y / o "desnaturalización". El almacenamiento del complejo pentamérico de la invención se prevé en una solución tampón que comprende un agente quelante y/o un agente estabilizante.

[0107] En general, cualquier agente quelante y/o agente estabilizador es adecuado con tal de permitir el almacenamiento del complejo pentamérico de la invención y no promover su desintegración. Un agente quelante útil ejemplar en el contexto de la presente invención es EDTA. El EDTA puede estar presente en dicha solución tampón a una concentración de 20

mM o menos, tal como 15 mM, 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, o 1 mM. En particular, el EDTA puede estar presente a una concentración de 3 mM o menos. Agentes estabilizantes ejemplares para uso de acuerdo con la presente invención incluyen glicol, arginina, sorbitol, glicerol y/o sacarosa. En particular, la solución tampón puede comprender arginina 100-200mM, sorbitol 100 mM, glicerol al 20% (p/v), 20% de sacarosa (p/v), 0,5% NP-40, 0,2% de Brij-35 y 0,5% Caps.

[0108] La solución tampón de acuerdo con la presente invención puede comprender tampón Tris, NaCl, KCl y tener un pH de 6,5. En particular, la solución tampón puede comprender tampón Tris 25 mM, NaCl 150 mM, KCl 3 mM. La solución tampón también puede ser un tampón de fosfato de sodio/potasio. Dicho tampón puede tener un pH entre 6,0 y 7,0.

Diseño vectorial

[0109] La presente invención proporciona uno o más vectores que comprenden marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican las proteínas de CMV UL128, UL130, UL131, gH y gL.

[0110] El vector puede contener elementos para la propagación en bacterias (por ejemplo *E. coli*), levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*), células de insectos y / o células de mamífero. Preferiblemente, dicho vector es un vector de baculovirus o un vector de baculovirus BacMam.

[0111] En el sistema de BacMam, vectores de baculovirus se usan para suministrar genes en células de mamífero. El sistema BacMam se puede utilizar para la entrega de genes a una amplia gama de líneas celulares y células primarias como las células huésped, una lista de ejemplos de los cuales se incluye aquí en otra parte. El baculovirus no modificada es capaz de entrar en las células de mamíferos, sin embargo sus genes no se expresan menos un promotor reconocible de mamífero se incorpora corriente arriba de un gen de interés. Por lo tanto, se prevé que el vector BacMam de la invención comprende un promotor de mamífero corriente arriba de los genes que codifican las proteínas del complejo pentamérico de la invención. El vector puede comprender elementos adicionales como se describe en el presente documento, por ejemplo, los genes de resistencia a antibióticos, elementos para la propagación en *E. coli*, *S. cerevisiae* etc.

[0112] En dicho vector de baculovirus el gen v-cath y/o Chia pueden romperse funcionalmente.

[0113] Generalmente, los marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifica las proteínas de CMV UL128, UL130, UL131A, gH y gL del complejo pentamérico de la invención pueden estar presente en uno o más vectores, por ejemplo, en dos vectores. Por consiguiente, uno, dos, tres, o cuatro de los ORF están en un primer vector, mientras que los restantes ORF/ORFs están en un segundo vector. Preferiblemente, sin embargo, dichos ORFs están presentes en un único vector. Los ORFs también pueden estar presentes en forma poligénica (EP1945773).

[0114] Los ORFs pueden por ejemplo estar situados en el siguiente orden de 5 'a 3' en el que dicho vector:

(i) gH, gL, UL128, UL130, UL131A;

o (ii) gL, UL128, UL130, UL131A, gH.

[0115] En particular, se prevé que

(A) en (i) el ORF de gH se transcribe en dirección 3 ', el ORF de gL se transcribe en dirección 5', el ORF de UL128 se transcribe en dirección 3 ', el ORF de UL130 se transcribe en dirección 3', y el ORF de UL131A se transcribe en dirección 3';

(B) en (i) el ORF de gH se transcribe en dirección 3 ', el ORF de gL se transcribe en dirección 3', el ORF de UL128 se transcribe en dirección 3 ', el ORF de UL130 se transcribe en dirección 3', y el ORF de UL131A e transcribe en dirección 3 ';

(C) en (ii) el ORF de gL se transcribe en dirección 5 ', el ORF de UL128 se transcribe en dirección 3', el ORF de UL130 se transcribe en dirección 3 ', el ORF de UL131A se transcribe en dirección 3', y el ORF de gH se transcribe en dirección 3'.

[0116] Los ejemplos adicionales de vectores son los siguientes vectores (pRBT136-x) para la generación del complejo pentamérico de CMV (la construcción y el procesamiento de dichos vectores se describe en el Ejemplo 1 de / EP2013 / 072717 PCT) y por lo tanto son vectores preferidos que se pueden aplicar para la expresión de un complejo pentamérico de la presente invención. En consecuencia, los vectores enumerados en la Tabla 1 a continuación se prefieren de los vectores ejemplares del vector que se utiliza para la co-expresión de una o más de las proteínas del complejo pentamérico. Cabe destacar que, independiente de la secuencia de nucleótidos específica que se muestra en la columna izquierda de la Tabla a continuación, la disposición de los genes que codifican las proteínas del complejo

pentamérico como se muestra en la Tabla 1 a continuación los arreglos también son preferidos que son una realización de la presente invención.

Abreviaturas: c: secuencia de consenso; H: His; SH: estreptavidina-His; V: VR1814, PCI: proteasa precision, PCII: precision y la proteasa TEV, DT: Herramienta de dimerización. Para la descripción de los genes en la Tabla 1 se utiliza la nomenclatura de CMV corta (gB, gH, gL, gO, así como "UL" sin prefijo y UL48 sin sufijo "A").

Tabla 1

Variante del vector (pRBT1 36-x) SEQ ID	Genes contenidos	Variante con herramienta de dimerización (DT) en gH
6	gH-GL-UL128-UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
7	gH-GL-UL128 (c) -UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
8	gH-GL (H) -UL128-UL130-UL131A, Towne	
9	gH-GL (H) -UL128 (c) -UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
10	gH-gL (SH) -UL128-UL130-UL131A, Towne	
11	gH-gL (SH) -UL128 (c) -UL130-UL131A, Towne	gH (DT; Towne)
12	gH-GL-UL128 (Towne) -UL130 (V) -UL131A (V)	
13	gH-GL-UL128 (c) -UL130 (V) -UL131A (V)	
14	gH (DT) -GL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
15	gH (DT) -GL-UL128 (c) -UL130-UL131A, Towne	
16	gH (DT) -GL (SH) -UL128-UL130-UL131A, Towne	
17	gH (DT) -GL (SH) -UL128 (c) -UL130-UL131A, Towne	
18	gH (sin anclaje a la membrana, His) -GL-UL128-UL130-UL131A, Towne	

19	gH (sin anclaje a la membrana, SH) -GL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
20	gH (sin anclaje a la membrana, H-ICP) -GL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
21	gH (sin anclaje a la membrana, H- PCII) -GL-UL128-UL130-UL131A, Towne	
67	gL-UL128c-UL130V-UL131AV-gH (sin anclaje a la membrana, H), Towne	
68	GLT-UL128T-UL130V-UL131AV-gH (sin anclaje a la membrana, H), Towne	
69	gL-UL128c-UL130V-UL131AV-2a-gH (sin anclaje a la membrana, H), Towne	
70	gL-UL128-UL130V-UL131AV-2a-gH (sin anclaje a la membrana, H), Towne	
71	gL-UL128c-2a-UL130V-2a-UL131AV-2a-gH (sin anclaje a la membrana, H), Towne	
72	gL-UL128c-2a-UL130V-2a-UL131AV-2a-gH (sin anclaje a la membrana, H), Towne	

[0117] El esqueleto del vector pRBT136 utilizado preferiblemente para esta invención contiene un origen de replicación para E. coli, por ejemplo, pBR322ori, y la levadura, por ejemplo 2 micron ori, los promotores polh y p10 para la expresión en células de insecto, los terminadores de SV40 y HSVtk, varios marcadores de resistencia (ampicilina, gentamicina), un marcador de selección de levadura (URA3), sitios de transposones (Tn) y un sitio de clonación múltiple (MCS).

[0118] A modo de ejemplo, un casete de expresión que contiene el promotor – gen de interés – terminador es amplificado por PCR en el sitio 5' con una saliente de 35-40nt en el sitio 5' y en el sitio 3' con una mayor y diferente saliente 35-40nt. Para la recombinación homóloga con un segundo casete de expresión, que tiene la misma organización, el producto de PCR contiene, la secuencia complementaria de la saliente de 35-40nt al sitio 3' y el sitio 5' del producto de la PCR anterior. El resto de las salientes en el sitio 5' del primer producto de la

PCR y el 3' sitio del segundo producto de PCR son homólogos al extremo 3' y al extremo 5' de un vector linealizado (pRBT136), respectivamente. Las recombinaciones homólogas en una secuencia se llevaron a cabo a continuación, en la levadura, preferiblemente en *Saccharomyces cerevisiae*. El número de los casetes de expresión / productos de PCR para ser montado en paralelo con la estrategia descrita antes se incrementa de acuerdo con el número necesario de genes a ser montado. Por este medio, múltiples genes / casetes de expresión son ensamblados en paralelo. Los genes ensamblados están flanqueados por los sitios de transposones. Estos se utilizan para la transposición de los genes en el genoma de baculovirus. El vector de co-expresión de baculovirus resultante se asegura de que los genes se expresan-
CO desde la misma célula individual. Rendimiento y composición de los productos varían en función del número de proteínas y los parámetros de producción. Los parámetros de producción, tales como la línea celular, el recuento de células en la infección (CCI), la cantidad de inóculo de virus recombinante (multiplicidad de infección, MOI) y el tiempo de la cosecha (TOH) se determinan con respecto al rendimiento y cosecha temprana utilizando un sistema de matriz y un sistema de producción a pequeña escala (2-20 ml; Ries, C., John C., Eibl R. (2011), Un nuevo enfoque de la escala fuera de servicio por el rápido desarrollo de los procesos basados Sf21 / BEVS - un estudio de caso En Eibl R., Eibl D. (editores): tecnología de un solo uso en la fabricación biofarmacéutica, 207-213, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey). Los parámetros definidos se utilizan entonces para producir el producto respectivo a escala más grande. El complejo pentamérico de la invención se fabrica usando técnicas de cultivo de tejidos desechables modernas que permiten la alta capacidad de producción.

[0119] El vector puede contener uno o más elementos adicionales, incluyendo, por ejemplo, un origen de replicación, promotores, sitios de clonación, marcadores genéticos, genes de resistencia a antibióticos, epítopes, genes informadores, secuencias dirigidas y / o etiquetas de purificación de proteínas. La persona experta en la técnica fácilmente sabrá que elementos son apropiados para un sistema de expresión específico.

[0120] En particular, el vector de acuerdo con la invención puede contener además elementos para la propagación en bacterias (*E. coli*), levadura (*S. cerevisiae*), células de insectos y / o células de mamífero, tales como orígenes de replicación, marcadores de selección, etc.

[0121] Se prevé que el vector comprende un promotor para la expresión génica. Cada uno de los ORFs descritos en este documento es impulsado por un promotor. Los promotores se

seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de polh, p10 y pXIV, promotores tardíos de baculovirus, promotor tardío VP39baculoviral, vp39polh de baculovirus tardío / promotor híbrido muy tardío, PCA / polh, PCNA, etl, p35, EGT, DA26 promotores baculovirales tempranos; CMV-IE1, UBC. EF-1, RSVLTR, MT, Simian virus 40, el promotor de CAG (promotor de beta-actina con promotor de CMV-IE1), promotor del virus de la hepatitis B / potenciador, promotor de ubiquitina C humana, promotor neuronal híbrido, pDS47, AC5 y PGAL y PADH. Cada uno de los ORFs descritos en este documento es seguido por una secuencia terminadora como terminador HSVtk, terminador SV40, o terminador de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

[0122] Una o más de las proteínas del complejo pentamérico de la invención pueden comprender la proteasa PreScission o PreScission y la proteasa TEV. Se prevé que, en particular, por ejemplo, la proteína gH y / o gL puede comprender proteasa PreScission o PreScission y proteasa TEV.

[0123] Se prevé además que la actividad de baculovirus v-cath y/o chíA pueden romperse funcionalmente, lo que significa que preferiblemente v-cath y/o chíA no funcional está presente y/o son expresadas en la mayoría de baculovirus que codifican una quitinasa (chiA) y una catepsina viral como proteasa (v-cath) que se retiene en las células y libera tras la lisis inducida por el virus para licuar los canales de acogida al final de la infección (Hawtin, RE et al Virología 1997; 238, 243-253.). Estos genes no son esenciales para la replicación de baculovirus y pueden, por lo tanto, ser inactivados, por ejemplo, por delección parcial o completa, la mutagénesis de inserción o por una o más mutaciones puntuales inactivantes.

[0124] El complejo pentamérico de la invención se puede preparar en varios niveles de pureza por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de la proteína total en masa, por ejemplo, tal como se determina mediante electroforesis en gel. Estos altos niveles de pureza hacen los complejos adecuados para, por ejemplo, el uso como un inmunógeno en aplicaciones de diagnóstico o como un antígeno en formulaciones de vacunas. Tal nivel de pureza es preferiblemente obtenible por (i) retirar las células hospederas del medio de cultivo como se describe en el presente documento, (ii) la aplicación de la cromatografía tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, la aplicación de la cromatografía de afinidad, si una versión etiquetada del complejo pentamérico se expresa por células hospederas, seguido por (iii) la eliminación de baculovirus, si se utiliza un sistema de expresión de baculovirus, a través de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio

aniónico en particular. Cualquiera de estos pasos se pueden repetir, con el paso (ii) que se repite preferiblemente como último paso. Estos pasos pueden estar en el orden (i), (ii) y (iii); (Ii), (i) y (iii); (I), (iii) y (ii); (Iii), (ii) y (i); (Ii), (iii) y (i); o (iii), (i) y (ii). Preferiblemente, la etapa (ii) se repite como último paso.

Composición

[0125] El complejo pentamérico de la invención también puede estar en la forma de una composición. La composición de la invención puede comprender además tampones, agentes reductores, agentes estabilizantes, agentes quelantes, agentes de relleno, agentes osmóticos de equilibrado (agentes de tonicidad); tensioactivos, polioles, antioxidantes; lioprotectores; agentes anti-espumantes; conservantes; y colorantes, detergentes, sales de sodio, y/o antimicrobianos, etc. La composición puede estar libre de poliacrilamida.

[0126] En algunas realizaciones, la composición no contiene poliacrilamida. En algunas realizaciones, la composición es un líquido por ejemplo, un líquido acuoso, no un gel. En algunas realizaciones, el complejo de proteínas no está inmovilizado dentro de la composición. Por ejemplo, dicho complejo pentamérico puede no estar presente en un gel, o en una película, membrana, papel o diapositiva.

[0127] Una composición puede ser estéril y/ o libre de pirógenos. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

Actividad neutralizante

[0128] Los inventores han descubierto que los complejos pentaméricos de la invención son capaces de inducir una respuesta inmunogénica. El término "respuesta inmunogénica" significa "respuesta inmune adaptativa", y en general incluye respuestas humorales y / o mediadas por células inmunes, preferiblemente *in vivo*. Preferiblemente, la respuesta inmunogénica implica la inducción de actividad neutralizante, por lo que la actividad neutralizante es preferiblemente en forma de anticuerpos neutralizantes.

[0129] Un "anticuerpo neutralizante" es un anticuerpo que puede neutralizar (suprimir o disminuir) el efecto biológico de un antígeno, por ejemplo, la capacidad de un patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedero. Preferiblemente, los anticuerpos neutralizantes generados en respuesta a la complejo pentamérico de proteína de la invención reaccionan de forma cruzada con partículas de virión de CMV, confiriendo de este modo

inmunidad contra la infección por CMV. Sin estar ligado por la teoría, se cree que los anticuerpos neutralizantes generados en respuesta a la proteína complejo pentamérico de la invención suprimen, o al menos disminuir la capacidad de las partículas de virión CMV para entrar epiteliales, endoteliales (Epi / CE) y / o de fibroblastos células, siendo preferidos el "y" combinación. Se prevé que la eficiencia de la entrada en las células se reduce en al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% , según lo determinado por las pruebas estandarizadas que son conocidos por los expertos en la técnica. Como se usa aquí, "eficiencia" se define como el número de células infectadas en presencia de anticuerpo como un porcentaje del número de infectados en ausencia de anticuerpo. Los ensayos de neutralización para la detección / identificación de / en la determinación de anticuerpos neutralizantes en particular puede ser hecho como se describe en la leyenda de la Figura 3 y en el Ejemplo 3.

[0130] Por tanto, se prevé que los complejos pentaméricos de la invención pueden ser capaces de inducir inmunidad contra la infección por CMV. Estas dos funciones (es decir, la inducción de una respuesta inmunogénica y la inducción de inmunidad) dependen de la retención de epítopes en los complejos pentaméricos de la invención que pueden provocar la producción de anticuerpos, incluyendo anticuerpos neutralizantes. Una gama de epítopes conformacionales para el complejo pentamérico son conocidos; ver Macagno (2010), Journal of Virology 84 (2010): 1005-1013.

[0131] En vista de lo anterior, la presente invención proporciona un complejo pentamérico que preferiblemente es capaz de inducir la actividad de neutralización que inhibe tanto la infección epitelial / endotelial (Epi/CE) y de fibroblastos.

Método para la producción

[0132] En un segundo aspecto, la presente invención también proporciona un método para la producción de un complejo pentamérico compuesto por proteínas de CMV UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115), que comprende

- (i) co-expresión de proteínas CMV baculovirus UL128, UL130, UL131A, gH (UL75) y gL (UL115) en una célula hospedera;
- (ii) purificar el complejo pentamérico de células y/o sobrenadante obtenidos a partir de dicha co-expresión; y

- (iii) almacenar opcionalmente el complejo pentamérico purificada en una solución tampón que comprende un agente quelante y / o un agente estabilizante.

[0133] Es de señalar que las realizaciones descritas en el contexto del complejo pentamérico de la invención también se aplican al método de la invención, mutatis mutandis.

Composición Farmacéutica / vacuna

[0134] En un tercer aspecto, se proporciona una composición farmacéutica o composición de vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo pentamérico de la invención u obtenible por el método de la invención y opcionalmente un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica o composición de vacuna de la presente invención también pueden comprender un vector como se describe aquí.

[0135] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para provocar un efecto terapéutico deseado. Por ejemplo en una composición de vacuna de la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser la cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune, por ejemplo, la producción de anticuerpos neutralizantes en un sujeto. El sujeto puede ser preferiblemente un mamífero, que puede ser, por ejemplo, un ratón, rata, cobaya, hámster, conejo, perro, gato, o primate. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

[0136] El término "farmacéuticamente aceptable" En particular, podrá media aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en los seres humanos.

[0137] La composición farmacéutica / vacuna de la invención se prevé para el tratamiento terapéutico de un sujeto. El término "tratamiento terapéutico" en todas sus formas gramaticales incluye el tratamiento terapéutico o profiláctico. Un "tratamiento terapéutico o profiláctico" comprende tratamientos profilácticos para la prevención completa de las manifestaciones clínicas y / o patológicas o tratamiento terapéutico dirigidas a la mejora o remisión de las manifestaciones clínicas y / o patológicas.

[0138] Para reducir la probabilidad de enfermedad congénita una vacuna profiláctica para prevenir la primera infección por CMV de la madre es deseable, mientras que se necesita una terapia eficaz en el caso de una madre es diagnosticado con una infección activa por CMV. Un complejo pentamérico de la presente invención está previsto particularmente para ser

aplicado como una vacuna profiláctica, por ejemplo, para las mujeres embarazadas, niños o pacientes con trasplante antes del trasplante.

[0139] La composición de vacuna puede comprender además la proteína gB, proteína gM, proteína pp65, IE-1 proteína, dímero de proteínas gL / gH, dímero de la proteína gM / GN, trimer de gL / GH / GO, partículas similares a virus (VLP) que comprende uno o más de la cápside o proteínas precursoras de la cápside, una o más proteínas de la superficie de CMV, y / o una o más proteínas del tegumento. "GB" se usa indistintamente con UL55 en el presente documento. "GM" se usa indistintamente con UL100 en el presente documento. "Pp65" se usa indistintamente con UL83 en el presente documento. "IE-1" se usa indistintamente con UL123 en el presente documento. "gO" se usa indistintamente con UL74 aquí. Es de entenderse que las proteínas mencionadas anteriormente no están restringidos con respecto a una secuencia específica. Mutado y formas truncadas de las proteínas mencionadas anteriormente también están previstas y abarcadas en la composición de vacuna de la presente invención. Las proteínas también pueden estar presentes en la vacuna de la invención en forma modificada. Modificaciones ejemplares se han descrito en el contexto de las proteínas del complejo pentamérico de la invención y también son aplicables a gB, gM, pp65, IE-1 y gO.

[0140] La vacuna o vector de vacuna, respectivamente, de la invención puede comprender además una forma soluble del receptor del complemento tipo 1 (sCR1).

[0141] Una "partícula similar a virus (VLP)" es un complejo de proteínas estructurales virales (por ejemplo, proteínas de superficie), que se asemeja a un virus, pero no contiene ningún material genético viral, y por lo tanto es no infeccioso. VLPs usadas de acuerdo con la presente invención puede comprender, en principio, cualquiera de las proteínas virales a los que se desea una respuesta inmune a ser provocada. Por ejemplo, las VLP usadas de acuerdo con la presente invención puede comprender la cápside CMV o precursoras de la cápside proteínas, proteínas de superficie y / o proteínas de tegumento, células B y / o epítopes de células T, y / o proteínas seleccionados del grupo de extranjera adicional secuencias antigénicas, citoquinas, motivos CpG, g-CMSF, CD19 y CD40 ligando y / o proteínas fluorescentes, proteínas útiles para los propósitos de purificación de las partículas o para la fijación de una etiqueta, y / o estructuras proteicas requeridas para los procesos de transporte.

[0142] Además la composición de vacuna puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica gB, gM, pp65, IE-1 o IE-2. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser ADN o

ARN. Por ejemplo, el ácido nucleico puede estar en forma de un vector o un plásmido. Formas complejadas y estabilizadas también se prevén.

[0143] La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende un vector que codifica un complejo pentamérico de la invención o cualquier otro complejo CMC como se describe en el presente documento. Dicho vector puede ser ADN o basada en ARN. Los vectores adecuados para uso de acuerdo con la composición de vacuna incluyen vectores basados en ADN tales como vectores de baculovirus, vectores BacMam, vectores de adenovirus, vectores lentivirales, vectores AAV, vectores de virus herpes, vectores de poxvirus y virus de Eppstein-Barr (EBV) vectores. El uso de ADN desnudo; por ejemplo en forma de un plásmido, y opcionalmente complejo do y / o en forma estabilizada (por ejemplo, lipoplexos, poliplexos, dendrímeros, virosomas y complejos con nanopartículas inorgánicas) También se prevé. Vectores basados en ARN adecuados incluyen vectores retrovirales, virus del bosque Semliki (SFV), virus Sindbis (SIN) y vectores del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).

[0144] Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden comprender además un virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que comprende una o más proteínas del complejo pentamérico CMV compuesto de UL128, UL130, UL131, gH (UL75) y gL (UL115).

[0145] Además, la presente invención proporciona una composición de vacuna para uso en un método de vacunación de un sujeto contra CMV, que comprende administrar la composición de cebado como dicha composición de vacuna y como impulsar una composición (i) gH / gL dímero, (ii) un UL130 / UL131A- dímero, (iii) GM / GN dímero (iv) a / gL / UL128 / UL130 / UL131A-pentámero gH, (v) GB, (vi) gM, (vii) pp65, (viii) IE-1, (ix) IE-2, (x) un virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que comprende una o más proteínas del complejo pentamérico CMV compuesto de UL128, UL130, UL131, gH (UL75) y gL (UL115), (xi) un virus vaccinia modificado Ankara (MVA) que comprende gB, gH un dímero / gL, la proteína pp65 o IE-1 de proteína, (xii) partículas similares a virus (VLP) que comprenden uno o más proteínas de la cápside o precursoras de la cápside, una o más proteínas de la superficie de CMV, o una o más proteínas de tegumento, (xiii) la secuencia de ácido nucleico que codifica uno cualquiera de los compuestos como se define en (i) a (xii), (xiv) péptidos de flagelina, (xv) motivos CpG, y / o (xvi) a LCMV dicho sujeto.

[0146] Dicha composición de refuerzo también se puede utilizar como imprimación composición y dicha composición de imprimación se utiliza como impulsar la composición.

[0147] En el régimen de impulso prima, se utiliza una vacuna de sensibilización / refuerzo que se compone de dos o más tipos de vacuna, incluyendo una vacuna utilizada en la inmunización primaria (primer o el cebado) y una vacuna utilizada en la inmunización de refuerzo (impulso o impulso). Por lo general, la vacuna utilizada en la inmunización primaria y la vacuna utilizada en la inmunización de refuerzo son diferentes unos de otros. La inmunización primaria y la inmunización impulsar pueden realizarse secuencialmente, esto es, sin embargo, no es obligatorio. El primer / refuerzo régimen incluye, sin limitación, por ejemplo, Primaria del ADN / impulso de proteínas, el primer ADN / refuerzo vector viral (por ejemplo, utilizando MVA).

Portador

[0148] Los términos "portador" y "excipiente" se usan indistintamente en el presente documento. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a diluyentes (rellenos, agentes de carga, por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina), disgregantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio), aglutinantes (por ejemplo, PVP, HPMC), lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio), agentes de deslizamiento (por ejemplo, SiO₂ coloidal), disolventes / co-disolventes (por ejemplo, acuosa vehículo, propilenglicol, glicerol), agentes tampón (por ejemplo, citrato, gluconatos, lactatos), conservantes (por ejemplo benzoato de Na, parabenos (Me, Pr y Bu), BKC), antioxidantes (por ejemplo BHT, BHA, ácido ascórbico), agentes humectantes (por ejemplo, polisorbatos, ésteres de sorbitán), agentes anti-espumantes (por ejemplo Simeticona), agentes espesantes (por ejemplo metilcelulosa o hidroxietilcelulosa), agentes edulcorantes (por ejemplo sorbitol, sacarina , aspartamo, acesulfame), agentes aromatizantes (por ejemplo de menta, aceites de limón, caramelo, etc), humectantes (por ejemplo, propileno, glicol, glicerol, sorbitol). La persona experta en la técnica será fácilmente capaz de elegir excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables, dependiendo, por ejemplo, en la formulación y vía de administración de la composición farmacéutica.

[0149] Una lista no exhaustiva de los excipientes farmacéuticamente aceptables ejemplar incluye liposomas (biodegradables); microesferas hechas de poli polímero biodegradable (D, L) ácido láctico-coglicólico (PLGA), microesferas de albúmina; polímeros sintéticos (soluble); nanofibras, complejos de proteínas de ADN; conjugados de proteína; eritrocitos; o virosomas. Diversas formas de dosificación de soporte basado comprenden nanopartículas sólidas lipídicas (GLC), nanopartículas poliméricas, nanopartículas cerámicas, nanopartículas

de hidrogel, nanopartículas de péptidos por polimerización, nanocristales y nanosuspensiones, nanocristales, nanotubos y nanocables, nanotransportadores funcionalizados, nanoesferas, nanocápsulas, liposomas, emulsiones lipídicas, microtúbulos lípidos / microcilindros, microburbujas de lípidos, lipoesferas, lipopolyplexes, micelas lipídicas inversas, dendrímeros, etosomas, múltiples compuestos cápsulas ultrafinas, aquasomes, pharmacosomes, coloidosomas, niosomas, discomes, proniosomes, microesferas, microemulsiones y micelas poliméricas. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son entre otras cosas se describe en Pharmaceutical Sciences de Remington, 15a Ed., Mack Publishing Co., New Jersey (1991) y Bauer et al., Pharmazeutische Technologie, quinto Ed., Govi-Verlag Frankfurt (1997).

Adyuvante

[0150] La composición farmacéutica o vacuna de la invención puede comprender además un adyuvante para estimular la respuesta del sistema inmune al complejo pentamérico. Adyuvantes ejemplares para uso de acuerdo con la presente invención incluyen compuestos inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidróxido de fosfato de calcio, aceites minerales, tales como aceite de parafina, virosomas, productos bacterianos, tales como bacterias muertas de Bordetella pertussis, Mycobacterium bovis, toxoides, orgánicos no bacterianos, tales como escualeno, timerosal, detergentes (Quil A), citoquinas, tales como IL-1, IL-2, IL-10 e IL-12, y composiciones complejo s, tales como el adyuvante completo de Freund, y el adyuvante incompleto de Freund. Generalmente, el adyuvante utilizado de acuerdo con la presente invención potencia preferentemente la respuesta inmune al complejo pentamérico de la invención y/o la modula hacia las respuestas inmunitarias deseadas.

[0151] Una variedad de rutas son aplicables para la administración de la composición farmacéutica o vacuna de la presente invención, incluyendo, pero no limitado a, oral, tópica, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o intraocular. Sin embargo, cualquier otra ruta fácilmente puede ser elegido por la persona experta en la técnica si se desea.

[0152] La dosis exacta de la composición farmacéutica / vacuna de la invención que se administra a un sujeto en necesidad del mismo dependerá de la finalidad del tratamiento (por ejemplo, tratamiento de la enfermedad aguda vs. vacunación profiláctica). Ajustes por la vía de administración, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración,

la interacción de fármacos y la gravedad de la condición puede ser necesario, y serán determinables con experimentación de rutina por los expertos en la técnica.

Fuente

[0153] En un cuarto aspecto, en el complejo pentamérico de la invención, al menos uno, dos, tres o cuatro de dichas proteínas pueden ser de una cepa de CMV distinta de la cepa CMV de la que son las proteínas restantes.

[0154] Una "cepa" de acuerdo con la presente invención se refiere a un CMV de genotipo variante. La expresión "de una cepa de CMV" se usa indistintamente con la expresión "derivado de una cepa de CMV" en la presente memoria y ha de entenderse en su sentido más amplio en el presente documento como "retrotraerse a" una cepa CMV, es decir, como que tiene un homólogo de origen natural o antepasado en una cepa de CMV. El término también abarca proteínas modificadas, por ejemplo, que tienen mutaciones tales como delecciones de aminoácidos, inserciones o conversiones con respecto a sus contrapartes de origen natural, o proteínas etiquetadas.

[0155] Por ejemplo, las proteínas de CMV se pueden derivar de CMV cepa Towne, Towne que tiene el genoma como depositadas en el NCBI GenBank bajo el número de acceso FJ616285.1, Toledo (GU937742.1), AD169 (FJ527563), Merlin (AY446894.2), TB20 / E (KF297339.1), VR1814 (GU179289) ., El Y aa en la posición 204 se intercambió por el aa F, de acuerdo con Patrone et al., J. Virol., 2005, 79, 8361-8373 el principal problema de la expresión de UL130 es el desplazamiento del marco en la misma posición que conduce a un aminoácido expansión a la siguiente ORF. Cabe destacar que el CMV cepa Towne (ACCN: FJ616285.1) en sí no expresa un complejo pentamérico funcional; sin embargo, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un complejo pentamérico funcional puede obtenerse a partir de Towne cuando se utiliza la secuencia de nucleótidos de Towne como depositado en GenBank bajo el número de acceso FJ616285.1 para la síntesis de genes (ORFs UL75 (ID de proteína: ACM48053.1), UL115 (ACM48085.1), UL128 (AAR31451.1), UL130, UL131A (AAR31453.1)). Tal un complejo pentamérico provocó la generación de anticuerpos neutralizantes en ratones, que fueron capaces de prevenir la entrada de CMV en células de fibroblasto. Por lo tanto, se prefieren los ORFs que codifican UL75, UL115, UL128, UL130, UL131A de CMV cepa Towne como depositado en GenBank bajo el número de acceso FJ616285.1. Del mismo modo, las proteínas codificadas por dichos ORFs se prefieren.

[0156] Además, los presentes inventores han encontrado que también es posible utilizar los ORFs presentes en el CMV cepa Towne que tiene en la posición 204 de la secuencia de aminoácidos de la ORF UL130 el aminoácido F (Phe), así como la reparación del marco en la misma posición de la cepa de laboratorio Towne (cultivados en fibroblastos de prepucio humanos) que resulta en un ácido amino funcional Y (Tyr). Uso de la pUL130 modificado todavía proporciona un complejo pentamérico funcional.

Virus

[0157] En un quinto aspecto, la invención proporciona una cepa modificada CMV Towne que tiene el genoma como depositadas en el NCBI GenBank bajo el número de acceso FJ616285.1 y que tiene en la posición 204 de la secuencia de aminoácidos de la ORF UL130 el aminoácido F, así como la reparación de desplazamiento del marco en la misma posición de la cepa de laboratorio Towne (cultivados en fibroblastos de prepucio humanos), resultando en un AA Y funcional.

[0158] Una mejor comprensión de la presente invención y de sus ventajas se tuvo a partir de los siguientes ejemplos, que se ofrecen sólo a efectos ilustrativos. Los ejemplos no están destinados a limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos

[0159] Ejemplo 1: Expresión, purificación y caracterización del complejo pentamérico de CMV

De acuerdo con los parámetros definidos de expresión de proteínas basado en la optimización sistemática (véase el Ejemplo 1 del documento PCT / EP2013 / 072717) el complejo CMV pentamérico comprende gpUL75 (GH-Su) -gpUL115 (gL) -gpUL128-gpUL130-gpUL131A se produce en desechable 2 L matraces de agitación (700 ml de volumen de cultivo) en gusano ejército caída células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) por co-expresión de una sola baculovirus (SEQ ID NO: 18). Los parámetros de producción fueron las siguientes: recuento de células inicial a la infección (CCI) de 2×10^6 células / ml, una multiplicidad de infección (MOI) de 0,25 pfu / ml, la incubación a 27 ° C a 100 rpm. Cosecha tuvo lugar después de la infección 3 días (pi) a una viabilidad en torno al 80%. La producción fue controlada por muestreo diario, la determinación de recuento de células y la viabilidad. El complejo que contiene sobrenadante se cargó en 2x 5 ml columnas HisTrap (GE Healthcare). El complejo se purificó usando un gradiente lineal de cero a 500 mM de imidazol más de 50 volúmenes de

columna (CV, equivalente a 500 ml. Las diferentes fracciones cromatográficas se analizaron por métodos bioquímicos. 150 l de diferentes fracciones se precipitaron con acetona, se resuspendió en 30 l Tris 20 mM, tampón de NaCl 150 mM, pH 7,4. Para cargar sobre una Bis-Tris NuPAGE gel al 4-12% (Invitrogen) 4x colorante de carga se añadió de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido por los electroforesis durante 15 min a 150 V y durante 45 min a 180 V usando tampón MOPS. Los geles se tiñeron durante la noche con reactivo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) y se destiñeron con agua. Para la concentración y la purificación adicional de una segunda cromatografía IMAC se realizó utilizando un 1 ml de columna HisTrap por un gradiente lineal más de 50 volúmenes de columna de imidazol 0-500 mM. Las diferentes fracciones se analizaron como la primera etapa de IMAC por teñido con Coomassie SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-His. Todo complejo que contiene fracciones se reunieron, se concentraron hasta un volumen final de 5 ml usando un 50 kDa cortó unidad de filtro Amicon (Millipore) y se carga de una etapa de purificación final en una columna de exclusión por tamaño (XK16 / 69, Superdex200pg) y se analizó mediante SDS-PAGE seguido por tinción de Coomassie e inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-His. La proteína total se determina mediante un ensayo de Bradford adaptado a un formato de placa de 96 pocillos (BCA, Pierce). 20 l de muestra desconocida o estándar se diluyó en 180 l de tampón. Diluciones seriadas de 2 veces se hacen para el estándar por triplicado (albúmina de suero bovino puro) o muestras desconocidas. 100 l de 2x Stock Bradford reactivo (Pierce) se añadió por pocillo. La placa se mezcla entonces y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas de microtitulación. El complejo CMV pentamérico contenida en las diferentes fracciones de la purificación basado cromatográfica se analizaron adicionalmente mediante la investigación de la unión de un anticuerpo específico contra la His-tag añadido a gpUL75 (gH,-ratón anti-His, AbD Serotec) y la propia gpUL75 (gH,-ratón anti-gH, Santa Cruz). Por lo tanto las diferentes muestras se diluyeron 1:10 en / tampón 100 l bien de recubrimiento (0,1 M Na₂HPO₄, pH 9) en una placa ELISA de 96 pocillos pre-absorbido y se incubaron durante la noche a 4 ° C. Después la placa se lavó 3 veces con 195 l de tampón / pocillo de lavado (1 x PBS, 0,05% de Tween 20), seguido por un bloqueo a temperatura ambiente con 195 l / pocillo de BSA 3% en solución PBS 1x 1 h. Después de 3 etapas de lavado el anticuerpo específico, el anticuerpo anti-His (anti-His), así como la anti-gpUL75 (anti-GH) en una concentración de 1 g / ml en 3% de BSA, PBS 1x, 0,05% de Tween 20, se añadió pH 7 (100 l / pocillo) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente seguido por otras 3 pasos de lavado. Para la detección (1 anti-ratón-IgG-HRP,; 1000 dilución en 3% de BSA, 1x PBS, 0,05% Tween 20, pH 7) una hora de incubación con el

anticuerpo secundario apropiado se llevó a cabo. La unión del anticuerpo específico para el complejo pentamérico se detectó usando 100 μ l / pocillo de reactivo sustrato TMP (BD Biosciences, San Diego, EE.UU., de acuerdo con el protocolo DEL FABRICANTE), por lo cual la reacción se detuvo después de 3-15 min con 100 μ l HCl 1 M, seguido por medición de la DO a 450 nm en un lector de microplacas.

Los ejemplos de vectores de expresión (pRBT136-x) para la generación del complejo de CMV pentamérico se ilustran en la Tabla 1, anteriormente.

Después de la expresión y purificación, el complejo pentamérico puede mezclarse con, por ejemplo, un agente quelante y / o agente estabilizante como se describe aquí.

[0160] Ejemplo 2: estudio *in vivo* en ratones

Para el estudio *in vivo* se utilizaron ratones Balb/C en un régimen de inducción-refuerzo-impulso. Cada grupo contenía 8 ratones y cada ratón recibió 20 g de proteína por inyección. Sueros preinmunes fueron tomadas después de 14 días de cuarentena de los ratones (día 0). La primera inyección se llevó a cabo 10 días después seguido por una inyección de refuerzo en el día 42. La primera hemorragia se hizo en el día 49. La segunda inyección de refuerzo se realizó a los 61 días seguido por un sangrado mayor en el día 70. El sangrado final tuvo lugar en día 85 seguido por la investigación de la respuesta inmune humoral y celular.

[0161] Ejemplo 3: respuesta inmune humoral basada en un ensayo de neutralización

La respuesta inmune humoral de la vacuna candidata basada en la complejo pentamérico (ID SEC: 18) se investigó mediante un ensayo de neutralización de los sueros de los ratones del Ejemplo 2 en comparación con los sueros de donantes de sangre humanos CMV negativos y positivos CMV. Un BAC (cromosoma artificial bacteriano) -la cepa VR1814 reconstituida que lleva una molécula de GFP por razones analíticas (fix-EGFP) se utilizó para la infección de fibroblastos (MRC-5) y epitelial (ARPE-19) las células para visualizar el potencial de neutralización de la sueros de ratón del Ejemplo 9. 2×10^4 células / pozo se sembraron en una placa de 96 pozos en medio RPMI que contiene 10% de FCS (suero de ternera fetal). Un pool de suero de la 8 ratones se generó y se añade en diluciones en serie de 2 veces (1:20 a 1:2560) en 100 μ l / pozo de medio RPMI / FCS. El virus fix-EGFP VR1814 mencionado anteriormente se añadió en una dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID) de 1.000 moléculas de virus / pozo que se determinó en un pre-ensayo. Las placas de 96 pozos se incubaron durante 8 días a 37 °C en una atmósfera controlada de CO₂. La determinación de

células verde se realizó en un lector de placas con los siguientes parámetros: fluoresceína-filtro [de excitación 485/20, modo de lectura inferior de emisión 530/25), tiempo: 0,1 seg, 25x mediciones/pozo después de 96 h de incubación. La potencia de neutralización se determinó como la dilución de los sueros capaz de mostrar una inhibición de la infección por virus 50%. Se realizaron los siguientes controles: control celular (células + PBS), el control de virus (células sólo infectadas) y 5 CMV positiva y 5 CMV sueros negativos de donantes de sangre humanos.

[0162] Ejemplo 4: respuesta inmune celular basada en los datos de ELISPOT (ensayo Multiplex)

En el día 85 del estudio in vivo (Ejemplo 2) los ratones se sacrificaron y los esplenocitos preparados para el análisis de 10 citocinas diferentes. Para la reestimulación de los esplenocitos se utilizaron el complejo, así como mezclas de péptidos sintéticos. Las siguientes proteínas fueron verificadas: HIVgag, pUL83, gpUL75, gpUL115, gpUL55, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A. Una predicción epítipo de cada proteína se realizó utilizando varios algoritmos bioinformáticos. Para cada proteína de una mezcla de 4 péptidos se generaron para la reestimulación de los esplenocitos. Para HIVgag se utilizó una mezcla de péptidos disponible comercialmente de 130 péptidos (JPT, Berlín). Las citoquinas (IFN-gamma, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF y gCMSF) fueron investigadas por un kit de ensayo multiplex de Invitrogen de acuerdo con el protocolo del fabricante.

[0163] Ejemplo 5: respuesta inmune celular basada en los datos de ELISPOT (ensayo Multiplex)

En el día 85 del estudio in vivo (Ejemplo 2) los ratones se sacrificaron y los esplenocitos preparados para el análisis de 10 citocinas diferentes. Para la reestimulación de los esplenocitos el complejo [2µg / ml] y re-CMV-VLPs [2µg / ml] se utiliza para recibir datos iniciales para un homólogo y / o heterólogo prime-boost régimen. Las siguientes proteínas fueron verificadas por el complejo: gpUL75, gpUL115, gpUL128, gpUL130 y gpUL131A. Las citoquinas (IFN-gamma, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF y gCMSF) fueron investigadas por un kit de ensayo multiplex de Invitrogen de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reestimulación con reCMV-VLPs de ratones inmunizados complejos condujo a una inducción de una respuesta de células T verificada por la secreción de IL-4, gCMSF y IL-5. La secreción de citocinas después de la reestimulación con el complejo de los mismos sueros fue menor en comparación con la anterior. Basándose en estos resultados

cebado con el complejo (en el rango de 1-10ug / ratón) y refuerzo con reCMV-VLP (que comprende más proteínas tales como gpUL83, gpUL55) podría ser un enfoque prometedor.

[0164] Ejemplo 6: Expresión, purificación y caracterización de los complejos pentaméricos de CMV que comprenden proteínas de dos cepas diferentes

De acuerdo con los parámetros definidos de expresión de proteínas basado en la optimización sistemática (véase el Ejemplo 1 del documento PCT / EP2013 / 072717) el complejo CMV pentamérico comprende gpUL75 (GH-Su) -gpUL115 (gL) -gpUL128-gpUL130-gpUL131A se produce en matraces de agitación desechables o bolsas de onda (volumen de cultivo hasta 25L) en una variante del gusano ejército caída células *Spodoptera frugiperda* (Super Sf9) por co-expresión de una sola baculovirus (SEQ ID NO: 67). Este complejo contiene proteínas a partir de dos cepas de HCMV Towne diferentes ([NCBI FJ616285.1 y VR1814 [NCBI GU179289). Los parámetros de producción fueron las siguientes: recuento de células inicial a la infección (CCI) de 2×10^6 células / ml, una multiplicidad de infección (MOI) en 0,25 pfu / ml, la incubación a 27 ° C a 100 rpm. Cosecha tuvo lugar después de la infección 3 días (pi 55-65h) con una viabilidad en torno al 80%. La producción fue controlada por muestreo diario, la determinación de recuento de células, el diámetro medio de celda, la agregación y la viabilidad. El complejo que contiene sobrenadante se cargó en columnas cargadas Ni_2^+ de Sefarosa (GE Healthcare) en diferentes escalas depende del volumen a granel. El complejo se purificó usando un gradiente de paso de cero a imidazol 500 mM sobre 23 volúmenes de columna (CV), equivalente a ~460 ml. Las diferentes fracciones cromatográficas se analizaron por métodos bioquímicos. 150-300µl de las diferentes fracciones se precipitaron con acetona, se resuspendió en 33 l Tris 20 mM, tampón de NaCl 150 mM, pH 7,4. Para la carga sobre una Bis-Tris NuPAGE gel al 4-12% (Invitrogen), se añadió 4x colorante de carga de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido por los electroforesis durante 15 min a 150 V y durante 45 min a 180 V utilizando tampón MOPS. Los geles fueron teñidos al menos 1h con reactivo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) y se destiñeron con agua. Para la concentración y la purificación adicional se realizó una segunda cromatografía IMAC usando una columna de sefarosa adicional (5 ml HisTrap) y un gradiente de paso sobre 31 volúmenes de columna (CV) de imidazol 0-500 mM. Se analizaron las diferentes fracciones como el paso primero IMAC por teñido con Coomassie SDS-PAGE. Todas las fracciones que contienen complejos se unificaron y se concentraron en un dispositivo centrífugo Macrosep PALL y se dializaron frente a tampón de almacenamiento que contiene 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM de KCl, pH 6,5, 3 mM EDTA. El complejo soluble purificado se analizó mediante SDS-

PAGE (s. Arriba) seguido por tinción con Coomassie y análisis densitométrico junto de diferentes cantidades de BSA.

[0165] Los ejemplos de vectores de expresión (pRBT136-x) para la generación del complejo pentamérico de CMV se ilustran en la Tabla 1, anteriormente.

[0166] Después de la expresión y purificación, el complejo pentamérico puede mezclarse con, por ejemplo, un agente quelante y / o agente estabilizante como se describe aquí.

[0167] Ejemplo 7: Estudio *in vivo* en ratones que comprenden diferentes antígenos

Para el estudio *in vivo* se utilizaron ratones Balb / C en un régimen de inducción-refuerzo-impulso. Cada grupo contenía 8 ratones y cada ratón recibió 5 mg, 10 mg o 20 g de proteína por inyección, ya sea con o sin adyuvante. Como control negativo se utilizó PBS, control positivo fue un lisado AD169 inactivado y para la investigación de baculovirus restantes (BV), el virus de la producción con el título de acuerdo de baculovirus restantes después de la purificación se inyectó también. Sueros pre-inmunes fueron tomadas después de 6 días de cuarentena de los ratones (día 0). La primera inyección se llevó a cabo 10 días después seguido por una inyección de refuerzo en el día 28. La primera hemorragia se hizo en el día 36. La segunda inyección de refuerzo se realizó a los 48 días seguido por un sangrado mayor en el día 55. El sangrado final tuvo lugar en día 60 seguido por la investigación de la respuesta inmune humoral y celular. Los pesos corporales se midieron semanalmente (Véase la Figura 14).

[0168] Ejemplo 8: respuesta inmune humoral basado en ensayo de neutralización.

La respuesta humoral inmune de la vacuna candidata basada en las variantes complejos pentaméricos (ID SEC: 18; SEQ ID: 67, así como en combinación con partículas similares a virus [VLP; SEQ ID: 6 en un vehículo que comprende UL86, UL85, UL48, UL83 y UL74]) fue investigado por un ensayo de neutralización de los sueros de los ratones del Ejemplo 7 en comparación con los sueros de donantes de sangre humanos CMV negativos y positivos CMV. Un BAC (cromosoma artificial bacteriano) la cepa VR1814 reconstituida que lleva una molécula de GFP por razones analíticas (fix-EGFP), así como la cepa TB40E se utilizaron para la infección de fibroblastos (MRC-5) y epitelial (ARPE-19) a las células visualizar el potencial de neutralización de los sueros de ratón del ejemplo. 2×10^4 células / pozo se sembraron en una placa de 96 pozos en medio RPMI que contiene 10% de FCS (suero de ternera fetal). Un grupo de suero de los ratones 4 de los 8 ratones se generó y se añade en

diluciones en serie 2 veces (1:20 a 1: 2560) en 100 µl / pozo de medio RPMI / FCS. El virus de la mencionada fix-EGFP VR1814 así como TB40E se añadieron en una dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID) de 1.000 moléculas de virus / pozo que se determinó en un pre-ensayo. Las placas de 96 pozos se incubaron durante 8 días a 37 °C en una atmósfera controlada de CO₂. La determinación de células verdes se realizó en un lector de placas con los siguientes parámetros: fluoresceína-filtro [de excitación 485/20, modo de lectura inferior de emisión 530/25), tiempo: 0,1 seg, 25x mediciones / pozo después de 96 h de incubación. La potencia de la neutralización se determinó como la dilución de los sueros capaz de mostrar una inhibición de la infección por virus del 50%. Se realizaron los siguientes controles: control celular (células + PBS), el control de virus (células sólo infectadas) y 5 CMV positiva y 5 CMV sueros negativos de donantes de sangre humanos. Curiosamente los anticuerpos neutralizantes liberados de la inmunización con el complejo pentamérico tienen así la capacidad para reducir o inhibir la entrada del virus a través de fibroblastos independientes de la cepa de virus. Estos datos son prometedores que se pudo llegar a una amplia respuesta inmune basado en la vacuna que contiene el complejo pentamérico (ver Figura 8).

[0169] Ejemplo 9: respuesta inmune celular basada en los datos de ELISPOT (ensayo Multiplex).

En el día 60 del estudio in vivo (Ejemplo 2) los ratones se sacrificaron y los esplenocitos fueron preparados para el análisis de 3 citocinas diferentes. Para la reestimulación de los esplenocitos se utilizó el lisado de virus AD169. Las citoquinas (IFN-gamma, IL-4, IL-5) fueron investigados por un kit de ensayo multiplex de Invitrogen de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secreción de citocinas después de la re-estimulación con un lisado de virus que contiene un complejo pentamérico no funcional condujo a una respuesta Th-1 y Th-2. Re-estimulación con la proteína funcional podría conducir a la inducción de citoquinas promotor. El adyuvante condujo a un aumento en una respuesta específica Th-2 medido a través de la secreción de IL-4. Baja dosis (5 mg) de complejo pentamérico parece ser más beneficiosa que la dosis alta (10 mg). Los antígenos de baculovirus dirigidos únicamente a una secreción de citoquinas insignificante (Véase la Figura 7). Una visión cualitativa se muestra en Figura 12.

[0170] Ejemplo 10: Mejora de la expresión, purificación y caracterización del complejo pentamérico de CMV que comprende proteínas de la cepa Towne

De acuerdo con los parámetros definidos de expresión de proteínas basado en la optimización sistemática (véase el Ejemplo 1 del documento PCT / EP2013 / 072717) el complejo CMV pentamérico comprende gpUL75 (GH-Su) -gpUL115 (gL) -gpUL128-gpUL130-gpUL131A se produce en matraces de agitación desechables o bolsas de onda (volumen de cultivo hasta 25L) en una variante del gusano ejército caída células *Spodoptera frugiperda* (Super Sf9) por co-expresión de una sola baculovirus (SEQ ID NO: 67). Este complejo contiene proteínas de HCMV cepa Towne ([NCBI FJ616285.1). Los parámetros de producción fueron las siguientes: recuento de células inicial a la infección (CCI) de 2×10^6 células / ml, una multiplicidad de infección (MOI) en el rango de 0,1 y 1, incubación a 27 ° C a 100 rpm. La cosecha se realizó en el día 2-3 después de la infección (pi 48-65h) a una viabilidad en torno al 80% (véase el cuadro 3). La producción fue controlada por muestreo diario, la determinación de recuento de células, el diámetro medio de celda, la agregación y la viabilidad. Para la producción en las bolsas de onda se eligieron diferentes parámetros: la velocidad de 19 a 22rpm, ángulo de 6 y se combinan con un suministro de oxígeno controlados. El complejo que contiene sobrenadante se cargó en columnas cargadas Ni_2^+ Sefarosa (GE Healthcare) en diferentes escalas depende del volumen a granel. El complejo se purificó usando un gradiente de paso de cero a 500 mM imidazol durante 7 a 15 volúmenes de columna (CV). Las diferentes fracciones cromatográficas se analizaron por métodos bioquímicos. Ya sea por carga directa de 15 l o por una precipitación con acetona de 150-300µl de las diferentes fracciones (se resuspendieron en Tris 33 mM I 20, 150 mM tampón de NaCl, pH 7,4). Para la carga sobre una Bis-Tris NuPAGE gel al 4-12% (Invitrogen), se añadió 4x colorante de carga de acuerdo con el protocolo del fabricante, seguido por los electroforesis durante 15 min a 150 V y durante 45 min a 180 V utilizando tampón MOPS. Los geles fueron teñidos al menos 1h con reactivo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) y se destiñeron con agua. Para reducir la cantidad de baculovirus restantes se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en modo negativo. El flujo a través que contiene el complejo pentamérico se concentró adicionalmente y se purificó mediante una cromatografía de afinidad usando una segunda columna de sefarosa más (escala depende del volumen) y un gradiente de paso a través de 15-30 volúmenes de columna (CV) de imidazol 0-500 mM. Se analizaron las diferentes fracciones como el paso primero IMAC por teñido con Coomassie SDS-PAGE. Todas las fracciones que contienen complejos se unificaron y calidad controlada. Una concentración con dispositivos centrífugos PALL Macrosep podría integrarse.

Desplazamiento de imidazol se desempeñasen por varias etapas de diálisis. La primera tampón de diálisis contiene EDTA 20 mM que después se reduce a una cantidad inferior 0-3mM EDTA. Un interruptor de tampón completa tal en PBS también es posible. Para el almacenamiento y la estabilización de los complejos agentes químicos diferentes, tales como Tween20, Tween80, se podría añadir glicerol. El complejo soluble purificada se analizó mediante SDS-PAGE (s. Arriba) seguido por tinción con Coomassie y análisis densitométrico junto de diferentes cantidades de BSA. La concentración de proteína se determinó por ensayo BCA, así como los baculovirus restantes. Restante genomas de baculovirus son determinados por qPCR basado en un gen de referencia viral (IE-1), así como por medición de la fluorescencia de los genomas virales (y ácidos nucleicos en general) y proteínas en cápsides virales con el contador de virus (Virocyt) utilizando una combinación de equilibrio colorantes. Este enfoque de "combinación" por la determinación de la absorbancia simultánea de ácidos nucleicos y proteínas de membrana virales permite la detección de la cantidad total de partículas virales mientras que las partículas infecciosas se midieron mediante ensayo en placa. Un dispositivo de Endosafe de Charles River (PTS20F) basado en el ensayo LAL se utilizó para la determinación de endotoxina usando cartuchos validados de un solo uso. Quant-iT™ Ensayo PicoGreen® de Invitrogen (P7589) se utilizó para la determinación del contenido de ADN de doble cadena en el producto final.

La identidad del producto, al final del proceso de DSP (IMAC-AEX-IMAC), se confirmó a través de un ELISA directo. El complejo se verificó con un anticuerpo α -gH- (Santa Cruz, sc-58113) y un anticuerpo α -His- (ABD Serotec, MCA1396) y se detectó con un anticuerpo α -ratón-HRP (Cell Signaling, 7076S) (Véanse las Figuras 10, 11 y 12).

Lotes de expresión ejemplares para la generación del complejo pentamérico de CMV se ilustran en Figura 12 (Ver también la Figura 9).

Después de la expresión y purificación, el complejo pentamérico puede mezclarse con, por ejemplo, un agente quelante y / o agente estabilizante como se describe aquí (Véase la Figura 13).