

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 877**

21 Número de solicitud: 202330185

51 Int. Cl.:

C07K 14/14 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

03.03.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.10.2024

Fecha de concesión:

13.02.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.02.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.00%)
Avda. das Ciencias 6 - 4D
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ ABELLA, Daniel;
BARREIRO PIÑEIRO, Natalia;
LÓPEZ TEIJEIRO, Adrián y
MARTÍNEZ COSTAS, José Manuel**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **PROTEÍNA DE FUSIÓN muNS CAPAZ DE FORMAR MICROESFERAS Y USOS DE LA MISMA**

57 Resumen:

Proteína de fusión muNS capaz de formar microesferas y usos de la misma.

La invención se relaciona con una proteína de fusión que codifica un polipéptido basado en la región mínima de la proteína muNS de los Orthoreovirus capaz de formar microesferas y/o nanosferas modificado para permitir la adición de polipéptidos en el C terminal.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 980 877 B2

DESCRIPCIÓN

PROTEÍNA DE FUSIÓN muNS CAPAZ DE FORMAR MICROESFERAS Y USOS DE LA MISMA

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende un polipéptido basado en la región mínima de la proteína muNS de los *Orthoreovirus* capaz de formar microesferas y/o nanosferas modificado para permitir la adición de moléculas en su extremo C-terminal.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los reovirus aviares son miembros del género *Orthoreovirus*, uno de los 12 géneros de la familia Reoviridae. Estos virus son importantes patógenos de aves y causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola. Los reovirus aviares son virus sin envoltura lipídica que se replican en el citoplasma de las células infectadas y poseen un genoma de 10 segmentos de ARN de doble cadena rodeados por una doble cubierta proteica concéntrica de 85 nm de diámetro. Los segmentos genómicos están divididos en tres clases en función de su movilidad electroforética: tres de la clase L ("large" o grande), otros tres de la M ("médium" o mediana) y cuatro de la S ("small" o pequeña). Con excepción del segmento S1, que es tricistrónico, todos los demás genes son monocistrónicos. Los segmentos genómicos se transcriben por medio de una polimerasa dependiente de ARN produciendo ARN mensajeros (ARNm) con una secuencia nucleotídica idéntica a la de la cadena positiva del segmento de ARN de doble cadena. Los ARNm virales ejercen una doble función en las células infectadas: programan la síntesis de proteínas virales en los ribosomas, y sirven como molde para la síntesis de las cadenas negativas de los segmentos genómicos.

15

20

25

30

35

Se ha descrito un nuevo sistema que utiliza la formación de inclusiones por parte de la proteína muNS de los reovirus de mamífero como una plataforma para detectar interacciones entre proteínas *in vivo* en células de mamífero (Miller et al., Mol Cell Proteomics., 2007 6 1027-1038) y que ha sido adaptado también para usarse en levaduras (Schmitz et al, Nat Methods 2009; 6 500-2). En este sistema, la proteína problema se fusiona con la zona C-terminal de muNS para que la fusión genere inclusiones citoplasmáticas y atraiga a ellas al ligando de la proteína problema. En el sistema de levaduras, estos autores demuestran que su sistema es superior al del doble híbrido en el número y tipo de interacciones detectadas, al menos con

las proteínas ensayadas en dicho trabajo. Sin embargo, este sistema presenta varios problemas, entre los que se destacan: i) ciertas proteínas pueden plegarse incorrectamente al fusionarlas con la muNS-Mi y perder capacidad de interacción con sus ligandos; ii) algunas proteínas pueden interferir con la capacidad de formación de inclusiones de muNS-Mi y, bien no formarlas o bien generar agregados intracelulares, viéndose enormemente alterada la detección de interacciones; iii) la localización intracelular de la proteína problema o del ligando puede no ser la adecuada para poder ser detectada en inclusiones citoplasmáticas.

El documento WO 2011/098652 describe un sistema que emplea la formación de inclusiones por la proteína muNS de *Orthoreovirus* como plataforma para la purificación de proteínas y para la detección de interacciones entre proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta plataforma está basada en la mínima región de la proteína muNS de *Orthoreovirus* aviar capaz de formar inclusiones, la cual recluta a las mismas una etiqueta peptídica y a las proteínas unidas dicha etiqueta. La etiqueta peptídica comprende la mínima región de la proteína muNS de un *Orthoreovirus* con capacidad de ser incorporada a las inclusiones formadas por la proteína muNS.

Así, es necesario mejorar el sistema con el fin de reducir su complejidad y aumentar la utilidad del sistema muNS.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado un sistema basado el fragmento mínimo que es capaz de formar inclusiones de la proteína muNS (muNS-Mi) en donde han conseguido suplantar la imposibilidad hasta ahora de modificar el extremo C-terminal de muNS-Mi, a través de la adición de una secuencia de reconocimiento de sortasa que no afecta la capacidad de muNS-Mi de formar inclusiones.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende los siguientes componentes:

- (i) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero, y

- una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores con capacidad de formar nanoesferas y/o microesferas y

(ii) un polipéptido que comprende el motivo de reconocimiento de una sortasa,

5 en donde el componente (ii) está fusionado al extremo carboxilo del componente (i) o la parte residual de un motivo de reconocimiento de sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa.

En otro aspecto, la invención se relación con una nanoesfera o una microesfera que comprende una proteína de fusión según la invención.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica una proteína de fusión según la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un casete de expresión que comprende un polinucleótido según la invención.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende un polinucleótido según la invención o un casete de expresión según la invención.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de vectores que comprende el vector según la invención y un segundo vector que comprende un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
- 25 - un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: -26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
- una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas y/o microesferas.

25

30 En otro aspecto la invención se relaciona con una célula que comprende una proteína de fusión según la invención, un polinucleótido, un casete de expresión, vector o una composición de vectores según la invención.

En otro aspecto, la invención se relación con un método para producir una proteína de fusión según la invención, en adelante método I de la invención, que comprende:

35

- (a) expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión,
- (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas o microesferas, y
- 5 (c) concentrar las nanoesferas o microesferas.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para producir una proteína, en adelante método II de la invención, que comprende:

- 10 (a) expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica una proteína de fusión según la invención y un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión que comprende:
 - (i) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - 15 - un polipéptido que comprende la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas y/o microesferas, y
 - (ii) un segundo polipéptido de interés,
 - 20 en donde y en donde el componente (ii) es la proteína producida;
- (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas, y
- (c) concentrar las nanoesferas y/o microesferas.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir un primer polipéptido de interés, en adelante método III de la invención, en donde el método comprende:

- (a) producir la proteína de fusión de la invención por el método I de la invención, en donde la proteína de fusión comprende:
 - un componente (iii) fusionado al extremo amino del componente (i), en donde el
 - 30 componente (iii) es el polipéptido de interés y
 - una secuencia de reconocimiento por una proteasa entre sus componentes (i) y (iii),
- (b) someter a las nanoesferas y/o microesferas a condiciones que conducen a su desintegración, produciéndose la separación de la proteína de fusión y las nanoesferas
- 35 y/o microesferas,

- (c) poner en contacto el producto resultante de la etapa (b) con una proteasa específica para la secuencia de reconocimiento que conecta los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión bajo condiciones adecuadas para la proteólisis de dicha proteína de fusión, con la consiguiente separación de los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión,
- (d) someter el producto de la etapa (c) a condiciones adecuadas para la formación de las nanoesferas y/o microesferas y
- (e) separar las nanoesferas y/o microesferas del componente (iii).

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína obtenible según el método I, II o III de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir una nanoesfera o microesfera según la invención, en adelante método IV de la invención, en donde dicho método comprende las etapas de:

- (a) producir la proteína de fusión por el método I según la invención, y
- (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica o composición inmunogénica que comprende la nanoesfera y/o microesfera según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una nanoesfera y/o microesfera según la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una nanoesfera o microesfera según la invención o una composición inmunogénica según la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de la lengua azul, en donde las proteínas de fusión que comprende la nanoesfera o la microesfera se caracterizan por comprender al menos uno de:

- la proteína exterior de la cápside 2 (VP2) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- la proteína del núcleo 7 (VP7) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- una proteína con una secuencia funcionalmente equivalente a cualquiera de las anteriores.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una nanoesfera o una microesfera según la invención o una composición inmunogénica según la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de la peste equina africana, en donde las proteínas de fusión que comprende la nanoesfera o la microesfera se caracterizan por comprender al menos uno de:

- 5 - la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de peste equina africana (AHSV);
- una proteína con una secuencia funcionalmente equivalente a cualquiera de las anteriores.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con una nanoesfera o una microesfera según la invención o una composición farmacéutica según la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de diabetes tipo 1, en donde la proteína de fusión que comprende la nanoesfera o la microesfera se caracteriza por comprender la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP).

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para inducir diabetes tipo 1 en un modelo animal que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la nanoesfera o de la microesfera según la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

Figura 1: Expresión de MiST-IC. A. Análisis PAGE de bacterias transformadas con pET Duet 1. MiST no inducidas (1) o inducidas con IPTG (2). La purificación de MiST se muestra en el tercer carril. Los marcadores de PM se muestran a la izquierda y la posición teórica de MiST a la derecha de la figura. B. Un grupo de las mismas bacterias analizadas en el carril 2 a, visualizadas mediante TEM.

25

Figura 2: Marcaje de MiST-IC con AZDye 488-Gly-Gly-Gly. A. NS purificadas obtenidas tras la expresión de las proteínas indicadas en la parte superior de cada imagen se incubaron con el compuesto fluorescente AZDye 488-Gly-Gly-Gly (fórmula bajo las imágenes) en presencia de sortasa A. El exceso de colorante se eliminó por diálisis y las NS se observaron al microscopio de fluorescencia. B. Muestras de muNS-Mi (1 y 3) o MiST (2 y 4), incubadas (3, 4) o no (1,2) con AZDye 488-Gly-Gly-Gly en presencia de sortasa A se resolvieron por PAGE y el gel sin teñir y sin fijar se visualizó bajo luz UV. Las bandas correspondientes a MiST marcado con fluorescencia (4) y al exceso de la etiqueta fluorescente (3, 4) se indican con flechas. C. Muestras idénticas a las analizadas en A fueron sometidas a un análisis Western-blot con anticuerpos contra muNS. Las posiciones de MiST y muNS-Mi se indican con flechas.

30

Figura 3: Marcaje de MiST-IC con AZDye 488-Gly-Gly-Gly. A. Extractos de las bacterias sin inducir (1) o inducidas con IPTG, previamente transformadas con el plásmido dual que expresa avPAL y, o bien muNS-Mi (2) o MiST (3). 4 y 5 corresponden a NS purificadas de los extractos correspondientes a 2 y 3.

Figura 4: Se transfectaron células HeLa con un plásmido que dirige la expresión de la proteína vírica muNS (muNS), dando lugar a una proteína de fusión formada por muNS fusionado en su extremo C-terminal con el epítipo hemaglutinina (muNS-HA). Las células se fijaron con paraformaldehído y analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-muNS. Se observa que la adición de HA en el extremo C-terminal provoca la pérdida de la capacidad de muNS de formar inclusiones citoplasmáticas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que es posible la obtención de proteínas de fusión que contienen la región mínima de la proteína muNS (muNS-Mi), que forma nanoesferas/microesferas, y una señal en el C-terminal de muNS-Mi que permite la modificación post-translacional de muNS-Mi tanto en monómero como en agregados en forma de nanoesferas/microesferas.

Proteína de fusión de la invención

Así, en un primer aspecto la invención se relaciona con una proteína de fusión, de ahora en adelante la proteína de fusión de la invención, que comprende los siguientes componentes:

- (i) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero, y
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores con capacidad de formar nanoesferas y/o microesferas y
- (ii) un polipéptido que comprende el motivo de reconocimiento de una sortasa, o la parte residual de un motivo de reconocimiento de sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa.

El término “proteína”, usado aquí indistintamente con “polipéptido”, se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los distintos aminoácidos se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.

- 5 El término “proteína de fusión”, según se usa en la presente invención, se refiere a polipéptidos que comprenden dos o más regiones que proceden de proteínas distintas o heterólogas. Una proteína de fusión, por definición, nunca se encuentra en la naturaleza como tal.

La proteína de fusión de la invención comprende dos componentes:

10

Componente (i) - Polipéptido

El componente (i) de la proteína de fusión de la invención es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- 15
- la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero, y
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores con capacidad de formar nanoesferas y/o microesferas.

20

En una realización particular, el polipéptido que forma parte de la proteína de fusión de la invención comprende o consiste en la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1), de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar.

- 25 El término “*Orthoreovirus* aviar” o “reovirus aviar”, según se usa en la presente invención, se refiere a uno de los doce géneros pertenecientes a la familia de virus *Reoviridae* y en concreto al grupo dentro del género que infecta aves. Presentan genomas de ARN de doble cadena y por ello, pertenecen al grupo III de virus.

- 30 El término “proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una de las proteínas no estructurales codificada por el gen M3 del reovirus aviar u *Orthoreovirus* aviar y es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar nanoesferas y/o microesferas cuando se expresa en ausencia de otros factores (Touris-Otero *et al.* Virology, 319; 94-1069). Se trata de una proteína de 635 aminoácidos definida por el número de acceso Ay608700 en
- 35 la base de datos NCBI (versión Ay608700.1, 7 de agosto de 2004) o por el número de acceso AAS78998 en la base de datos NCBI (versión AAS78998.1, 10 de abril de 2006). En una

realización particular, la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar tiene la secuencia SEQ ID NO: 3.

La secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar es un
5 fragmento de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar que comprende la región mínima de la proteína muNS de un *Orthoreovirus* que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El término “inclusión(es)”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a agregados
10 nucleares o citoplásmicos, normalmente de proteínas. En concreto, la proteína que forma las inclusiones en el género *Orthoreovirus* es la proteína muNS o μ NS, que es capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales (Touris-Otero *et al.*, *supra*). Cuando las inclusiones son formadas por la proteína muNS-Mi, estas son de tamaño reducido y esféricas, formando lo que se designan por “nanoesferas” y/o “microesferas”. Las
15 nanoesferas y microesferas se distinguen por su tamaño (ver abajo). Así, en la presente invención, el término “inclusiones” engloba igualmente los términos “nanoesfera” y “microesfera”.

La capacidad para formar inclusiones de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar viene dada
20 por la presencia de la región mínima de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar correspondiente a los residuos 448 a 635 de dicha proteína. Sin embargo, cualquier fragmento de la proteína muNS de *Orthoreovirus* aviar que contenga dicho fragmento mínimo es capaz de formar dichas inclusiones.

Así, en una forma de realización particular, el componente (i) de la proteína de fusión de la
25 invención comprende la secuencia completa de la proteína muNS de *Orthoreovirus* aviar, o un fragmento de la proteína muNS de *Orthoreovirus* aviar comprendido entre los residuos 1 y 635 de dicha proteína, o desde el residuo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320,
30 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 447 y hasta el residuo 635 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de *Orthoreovirus* aviar. En otra realización particular el componente (i) de la proteína de fusión de la invención comprende desde un fragmento desde el residuo 447 y hasta el residuo 636 de la proteína de *Orthoreovirus* aviar, o desde el residuo 447 y hasta el residuo 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, o hasta
35 el residuo 721 de la proteína de *Orthoreovirus* aviar. En otra realización particular el componente (i) de la proteína de fusión de la invención comprende desde un fragmento de la

proteína muNS de *Orthoreovirus* aviar comprendido entre los residuos 10 y 720 de dicha proteína, o entre los residuos 10 y 700, o entre los residuos 20 y 700, o entre los residuos 30 y 700, o entre los residuos 40 y 700, o entre los residuos 60 y 680, o entre los residuos 80 y 660, o entre los residuos 100 y 640, o entre los residuos 120 y 635 de dicha proteína.

5

En otra realización particular, el polipéptido que forma parte de la proteína de fusión de la invención comprende o consiste en la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero.

10 El término "*Orthoreovirus* de mamífero", según se usa en la presente invención, se refiere a uno de los doce géneros pertenecientes a la familia de virus Reoviridae y en concreto al grupo dentro del género que infecta mamíferos. Presentan genomas de ARN de doble cadena y por ello, pertenecen al grupo III de virus.

15 El término "proteína muNS o μ NS del *Orthoreovirus* de mamífero", según se usa en la presente invención, se refiere a una de las proteínas no estructurales codificada por el reovirus mamífero u *Orthoreovirus* de mamífero y es la única proteína del reovirus de mamífero capaz de formar microesferas cuando se expresa en ausencia de otros factores virales (Becker, M. M. et al. 2003. J. Virol. 77:5948–5963). Se trata de una proteína de 721 aminoácidos definida
20 por el número de acceso ABP48918 en la base de datos NCBI (versión ABP48918.1, 11 de abril de 2008) (SEQ ID NO: 4).

En la forma de realización preferida en la que la proteína muNS de *Orthoreovirus* es la proteína muNS de *Orthoreovirus* de mamífero, la región mínima de la proteína muNS de *Orthoreovirus*
25 de mamífero *Orthoreovirus* de mamífero que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprende la región correspondiente a los residuos 518 a 721 (SEQ ID NO: 2). En una realización aún más preferida, el componente (i) de la proteína de fusión de invención comprende la proteína completa o bien desde el residuo 2 y hasta el residuo 721 de dicha proteína, o desde el residuo 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130,
30 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 470, 480, 490, 500, 510 y hasta el residuo 721 de dicha proteína.

En una realización particular, el polipéptido que forma parte de la proteína de fusión de la
35 invención comprende o consiste en una variante funcionalmente equivalente de (i) la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de (ii) la

secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero, con capacidad de formar nanoesferas y/o microesferas.

En una realización particular, las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero conservan al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100% de la capacidad de formar nanoesferas/microesferas de las secuencias de la que derivan.

Las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero incluyen aquellas que muestran al menos al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de las que derivan.

El grado de identidad entre las variantes y las secuencias de la cual derivan se determina utilizando algoritmos y métodos informáticos que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente utilizando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. y col., J. Mol Biol, 215: 403 - 410 (1990)]. En una realización más particular, la identidad de secuencia entre la variante funcionalmente equivalente y la secuencia de la proteína de la cual deriva se calcula a lo largo de toda la longitud del polipéptido.

Por "variante funcionalmente equivalente" se entiende todos aquellos péptidos derivados de la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero mediante modificación, inserción, sustitución y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las secuencias de la proteína muNS de las que derivan.

La secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar y la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero

presentan la capacidad de formar nanoesferas y/o microesferas en una célula. Las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar y de la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero, conservan sustancialmente la capacidad de dichas secuencias de formar nanoesferas/microesferas en una célula. Métodos adecuados para determinar la capacidad de formar nanoesferas/microesferas en una célula incluyen, pero no se limitan al método descrito en el Ejemplo 1 de la solicitud de patente WO 2011/098652 basado en la expresión de la proteína de interés en una célula y análisis de formación de las nanoesferas/microesferas (inclusiones) a través de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos policlonales contra el epítipo de interés o un epítipo fusionado a la proteína de interés, pudiéndose comprobar la formación de nanoesferas y/o microesferas. En una realización particular, las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero conservan al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o el 100% o más de la capacidad de dichas secuencias de formar nanoesferas/microesferas en una célula.

En una realización particular, las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero incluyen aquellas que muestran al menos al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de las que derivan y conservan al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o el 100% o más de la capacidad de dichas secuencias de formar nanoesferas/microesferas en una célula.

Como será evidente para el experto en la técnica, podrá ser de utilidad que el componente (i) de la proteína de fusión de la invención tenga en su extremo amino otro polipéptido de interés. Así, en una realización particular, la proteína de fusión de la invención comprende además un componente (iii) fusionado al extremo amino del componente (i), donde el componente (iii) es un primer polipéptido de interés.

Como comprenderá el experto en la materia, podrá ser de utilidad la separación del componente (iii) del componente (i). Una posibilidad para poder separar dichos componentes

es el uso de un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación de los dos componentes.

En una realización particular, el componente (iii) está fusionado al componente (i) por una
 5 secuencia de reconocimiento por proteasas. El término “proteasa”, o “peptidasas”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas, utilizando para eso una molécula de agua, por lo que se clasifican como hidrolasas. Ejemplos de sitios de corte de proteasas adecuados para incorporación en la proteína de fusión de la invención, sin limitación, incluyen enteroquinasa (sitio de corte
 10 DDDDK; SEQ ID NO: 5), factor Xa (sitio de corte IEDGR; SEQ ID NO: 6), trombina (sitio de corte LVPRGS; SEQ ID NO: 7), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG; SEQ ID NO: 8), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP; SEQ ID NO: 9), inteínas y similares. En una realización particular la secuencia de reconocimiento por proteasas es una secuencia de reconocimiento por enteroquinasa o una secuencia de reconocimiento por factor Xa.

En otra realización particular el componente (iii) comprende un péptido señal de la vía secretora.

El término “péptido señal de la vía secretora”, usado aquí indistintamente con “secuencia
 20 señal” o “péptido señal” o “péptido señal de localización”, se refiere a un péptido corto (5-30 aminoácidos de longitud) presente en el extremo N-terminal que dirige el transporte de proteínas destinadas hacia la vía secretora, ya sean proteínas que residen en ciertos orgánulos (RE, complejo de Golgi o endosomas), proteínas secretadas por la célula o proteínas insertadas en la membrana celular. El péptido señal dirige la translocación al RE de
 25 la proteína a la cual va unido. Durante o después de la translocación, el péptido señal es escindido por una peptidasa señal, generando un péptido señal libre y una proteína madura. Ejemplos no limitativos de péptidos señal de la vía secretora incluyen los péptidos señal que aparecen en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas, secuencias señal de la cadena invariante
 30 o de las proteínas Lampl, Tapasin, Erp57, Calreticulin, Calnexin. En una realización particular, la secuencia de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en:

- la secuencia MGWSLILLFLVAVATGVHSQ (SEQ ID NO: 10);
- la secuencia MMSFVSLLLVGILFWATEAEQLTKCEVFQ (SEQ ID NO: 11);
- el péptido señal de PTH1R humana (MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYAL, SEQ ID NO:
 35 12);

- secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana (MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAK, SEQ ID NO: 13)
- el péptido señal de mGluR5 humana (MVLLILSVLLLKEDVRGSA, SEQ ID NO: 14);
- el péptido señal de GABAB2R humana
- (MASPRSSGQGP PPPPPPPPPARLLLLLLLPLLLPLAPG, SEQ ID NO: 15);
- el péptido señal de la calreticulina humana (MLLSVPLLLGLLGLAVA, SEQ ID NO: 16);
- y
- el péptido señal de la cadena pesada de IgY2b humana, (MGWSCIIILFLVATATGKGLTVAGLRSGHIYG, SEQ ID NO: 17).

En una realización preferida, el péptido señal de la vía secretora comprende la secuencia MGWSLILLFLVAVATGVHSQ (SEQ ID NO: 10).

Cuando la proteína de fusión comprende un péptido señal y transita por las vías secretoras, la ausencia de glicosilaciones permite una formación más eficiente de inclusiones en dichas vías secretoras.

En una realización particular el componente (i) de la proteína de fusión de la invención comprende un péptido señal de la vía secretora y no contiene N-glicosilaciones. Por lo tanto, en una realización particular, el componente (i) carece de secuencias consenso de N-glicosilaciones. El término "secuencia consenso de N-glicosilación", según se usa en la presente invención, se refiere a la secuencia compuesta por -Asn-X-Ser/Thr, en donde X no es prolina, que es la secuencia consenso más representativa, así como las secuencias consenso de N-glicosilación menos abundantes, tales como las secuencias -Asn-Gly- , -Asn-X-Cys y -Asn-X-Val.

En una realización preferida, el componente (i) comprende un péptido señal de la vía secretora y la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 57 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, el componente (i) comprende la secuencia SEQ ID NO: 18.

En otra realización preferida, el componente (i) comprende un péptido señal de la vía secretora y la secuencia SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 57 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 19.

En otra realización preferida, el componente (i) comprende un péptido señal de la vía secretora y la secuencia SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 113 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 20.

5

En otra realización preferida, el componente (i) comprende un péptido señal de la vía secretora y la secuencia SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde los aminoácidos en posición 57 y 113 no son restos de Asn. En una realización aún más preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 21.

10

Como será evidente para el experto en la materia, puede ser conveniente que la proteína de fusión de la invención contenga además una etiqueta para facilitar su purificación.

Por tanto, en otra realización particular el componente (i) y/o el componente (iii) comprende un péptido para facilitar su purificación. En otra realización particular el componente (i) comprende un péptido para facilitar su purificación, en donde dicho péptido está fusionado en el extremo amino del componente (i).

El término “péptido para facilitar la purificación”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un péptido útil para el aislamiento o purificación del componente (iii) o de la proteína de fusión de la invención. Así, dicho péptido es capaz de la unión de uno o más ligandos de una matriz de afinidad, tal como una cromatografía de afinidad. Un ejemplo de dicho péptido es la cola de histidinas (His-tag) que puede contener seis residuos de histidinas (His6 o H6), que se puede unir a una columna de níquel o cobalto con alta afinidad. Otros ejemplos de dichos péptidos incluyen, aunque no se limitan a, Arg-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo capaz de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag (reconocido por un anticuerpo anti-c-myc), SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. El experto en la materia entenderá que los péptidos para facilitar la purificación también son útiles para detección del polipéptido al cual están unidos. Esto se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales, por ejemplo, técnicas basadas en anticuerpos que reconocen específicamente el péptido para facilitar la purificación.

El péptido para facilitar su purificación puede estar en posición N- ó C-terminal con respecto al componente (iii). En una realización preferida, el péptido para facilitar su purificación está en posición N-terminal con respecto al componente (iii). En otra realización preferida, el

péptido para facilitar su purificación está en posición C-terminal con respecto al componente (iii).

Componente (ii) - polipéptido que comprende el motivo de reconocimiento de una sortasa o la parte residual de dicho motivo

Tal como se ha descrito, la proteína de fusión es compuesta por al menos dos componentes, siendo que el segundo es un polipéptido que comprende el motivo de reconocimiento de una sortasa.

El término “sortasa”, o “enzima sortasa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima procariota que tiene un dominio catalítico con actividad capaz de escindir selectivamente un enlace peptídico de una cadena polipeptídica en el motivo de reconocimiento de la sortasa y catalizar una reacción de transpeptidación que da lugar a la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo terminal creado por la escisión y una proteína de superficie de la pared celular de una célula. Las sortasas están presentes en casi todas las bacterias Gram positivas, así como en algunas bacterias Gram negativas y Archaea.

Las sortasas se clasifican en cuatro clases diferentes (A, B, C, D). Cada una de las clases de sortasas escinde un motivo de reconocimiento distinto, y algunos miembros de la clase escinden múltiples motivos peptídicos. La Sortasa de Clase A escinde típicamente el motivo de reconocimiento LPXTG (SEQ ID NO: 22), donde X representa cualquier aminoácido, entre la treonina y la glicina. El péptido escindido mantiene el residuo de glicina en su extremo amino, y la proteína escindida se une al peptidoglicano en el residuo de treonina. En una realización particular, la sortasa es una sortasa A, un fragmento enzimáticamente activo, o una variante o derivada de la misma. En otra realización particular, la sortasa A es la sortasa de tipo salvaje de *Staphylococcus aureus*, la sortasa evolucionada (eSrtA), la eSrtA(2A-9), la eSrtA(4S-9) o la sortasa A de *Streptococcus pyogenes*. En una realización particular, la sortasa es la sortasa de *S. aureus*. En una realización particular el motivo de reconocimiento de la sortasa es la secuencia de aminoácidos LPXTG (SEQ ID NO: 22), en donde X es cualquier aminoácido.

El término “motivo de reconocimiento de una sortasa” tal y como se usa en la presente descripción hace referencia a una pequeña secuencia de aminoácidos (3 a 7 aminoácidos), reconocida por la enzima sortasa y donde se realiza la reacción de transpeptidación. Esta secuencia se localiza normalmente en el C-terminal de la proteína. En otra realización

particular el motivo de reconocimiento de la sortasa es la secuencia de aminoácidos LPETG (SEQ ID NO: 23).

La presencia del componente (ii) en la proteína de fusión de la invención permite la modificación de la proteína a través de la unión covalente de cualquier molécula que contenga un motivo aceptador de sortasa. En una realización particular la proteína de fusión comprende además un componente de interés unido covalentemente al motivo de reconocimiento de una sortasa o a la parte residual de un motivo de reconocimiento de sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa.

Como es obvio para el experto en la técnica, la modificación del motivo de reconocimiento de sortasa por una reacción mediada por sortasa, produce una “parte residual de un motivo de reconocimiento de sortasa” en donde la proteína de fusión de la invención está modificada por escisión del motivo de reconocimiento de la sortasa, debido a la escisión de uno o más aminoácidos del C-terminal de la secuencia del motivo de reconocimiento de la sortasa. Así, cuando el motivo de reconocimiento de sortasa es la secuencia de aminoácidos LPXTG (SEQ ID NO: 22), en donde X es cualquier aminoácido, la parte residual de dicho motivo es LPXT, puesto que es la parte que resta tras la escisión proteolítica por parte de la sortasa de la glicina carboxilo-terminal.

En otra realización particular el componente de interés se caracteriza por comprender un motivo aceptador de sortasa.

El término “motivo aceptador de sortasa”, tal y como se usa en la presente descripción hace referencia a una secuencia polipeptídica que actúa como aceptor para la transferencia mediada por la sortasa de un polipéptido al motivo de reconocimiento de la sortasa. En una realización particular, el motivo aceptor de la sortasa está situado en, cerca, adyacente o hacia el extremo N- o C-terminal del componente de interés y comprende una secuencia de aminoácidos no polares, siendo dicha secuencia de al menos un aminoácido de longitud. En aún otra realización particular, la secuencia de aminoácidos no polares comprende al menos entre 1 y 20 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 aminoácidos o cualquier intervalo de los mismos) de longitud. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos no polares es o comprende una o una pluralidad de glicinas o alaninas. Los motivos aceptores de sortasa ejemplares incluyen G[G]_n, donde n=0-5 y A[A]_n, donde n=0-5.

En una realización particular el componente de interés se caracteriza por comprender un motivo aceptador de sortasa, en donde el motivo aceptador de sortasa se caracteriza por comprender una secuencia oligoglicina de al menos 3 glicinas.

5 En una realización particular el componente de interés se selecciona de un grupo que consiste en: ligandos de receptor de tipo Toll (TLR de "Toll-Like Receptors"), monofosforil lípido A (MPL A), oligonucleótidos seleccionados de islas CpG y ácido polinosínico:polícido (poly(I:C) – número CAS: 24939-03-5), saponina, moléculas lipídicas, moléculas de recubrimiento, oligosacáridos, anticuerpos, nanoanticuerpos, afitinas, antígeno viral, un antígeno bacteriano,
 10 un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental, un antígeno tumoral, en donde el componente de interés se caracteriza por comprender una secuencia oligoglicina de al menos 3 glicinas. Ejemplos no limitantes de componentes de interés serían ligandos de TLR (Toll-Like Receptors), MPL (monophosphoryl lipid A), oligonucleótidos (CpG, poly(I:C), etc.), saponina, moléculas lipídicas, otros lípidos, moléculas de recubrimiento de diversos fines,
 15 tales como poligliceroles, polietilenglicol, quitosanos, poli(oxazolin) (POX), poli(hidroxipropil metacrilato) (PHPMA), poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA), poli(N-(2-hidroxipropil metacrilamida) (HPMA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(N,N-dimetil acrilamida) (PDMA), poli(N-acrilolmorfolina) (PACM), etc., oligosacáridos, moléculas que dirijan in vivo las esferas a diferentes dianas tales como nanobodies, afitinas y anticuerpos. Como será obvio para el
 20 experto en la técnica se podrán acoplar cualquier molécula que contenga una oligoglicina de al menos 3 glicinas que tengan su N-terminal libre.

Como será obvio para el experto en la materia los antígeno viral, antígeno bacteriano, antígeno fúngico, alérgeno, antígeno medioambiental, un antígeno tumoral previamente
 25 definidos son igualmente válidos como componentes de interés, en donde el componente de interés comprende una secuencia oligoglicina de al menos 3 glicinas.

Nanoesferas y/o microesferas de la invención

30 Como se mencionado anteriormente, la proteína de fusión de la invención tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula. Dichas inclusiones pueden variar en tamaño y forma, y se designan nanoesferas o microesferas.

Así, otro aspecto de la presente invención hace referencia a una nanoesfera o una microesfera
 35 que comprende al menos una proteína de fusión de la invención, de ahora en adelante la nanoesfera/microesfera de la invención.

Todas las definiciones y realizaciones particulares descritas en relación con otros aspectos de la invención son igualmente válidas y aplicables al presente aspecto.

- 5 Tal como descrito anteriormente, las nanoesferas y las microesferas tienen tamaños distintos. Así, en una realización particular la nanoesfera tiene un tamaño entre 300 nanómetros (nm) y 550 nm. En otra realización particular la microesfera tiene un tamaño entre 1 micrómetro (µm) y 4 µm.
- 10 La estructura de la región mínima de la proteína muNS del *Orthoreovirus* comprende dos regiones de dominios coil en los extremos N y C-terminal, C1 y C2, y una región interdominio designada intercoil (IC). Este dominio corresponde a la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o a la secuencia 561-622 de la proteína muNS de *Orthoreovirus* de mamífero (SEQ ID NO: 26). Dicho fragmento presenta la capacidad de
- 15 incorporarse en nanoesferas y microesferas formadas por la proteína muNS de *Orthoreovirus*.

Así, en una realización particular la nanoesfera/microesfera de la invención comprende una segunda proteína de fusión que comprende los siguientes componentes:

- (a) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
- un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
- una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que
- 25 mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas y/o microesferas, y
- (b) un segundo polipéptido de interés.

Por "variante funcionalmente equivalente" se entiende todos aquellos péptidos derivados de la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la

30 secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero mediante modificación, inserción, sustitución y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las secuencias de la proteína muNS de las que derivan.

35 La secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar y la secuencia 561-622 (SEQ ID NO26X) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero

presentan la capacidad de incorporarse a microesferas/nanoesferas formadas por la proteína de fusión de la invención en una célula. Las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar y la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero conservan sustancialmente la capacidad de dichas secuencias de incorporarse a las microesferas/ nanoesferas formadas por la proteína de fusión de la invención en una célula. Métodos adecuados para determinar la capacidad de incorporarse en las microesferas/ nanoesferas incluyen, pero no se limitan al método descrito en el Ejemplo 3 de la solicitud de patente WO 2011/098652 basado en la formación de las nanoesferas/microesferas (inclusiones) y expresión de la proteína de interés en forma de proteína de fusión asociada a los fragmentos que la dirigen a las nanoesferas/microesferas. Posteriormente, se procedería a llevar a cabo inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos policlonales contra el epítipo HA o el epítipo de interés, pudiéndose comprobar la incorporación de dichos fragmentos a las nanoesferas/microesferas.

Las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero tienen capacidad de incorporarse a microesferas y/o nanoesferas. En una realización particular, las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero conservan al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100% de la capacidad de incorporarse a nanoesferas y/o microesferas de las secuencias de la que derivan.

Las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero incluyen aquellas que muestran al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de las que derivan.

En una realización particular, las variantes funcionalmente equivalentes de la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar o de la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero conservan al menos el

50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100% de la capacidad de incorporarse a nanoesferas y/o microesferas de las secuencias de la que derivan y muestran al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de las que derivan.

Los dos componentes (a) y (b) de la segunda proteína de fusión pueden estar conectados en cualquier orden, es decir, el componente (b) puede estar fusionado al extremo amino terminal del componente (a) o el componente (a) puede estar fusionado al extremo amino terminal del componente (b). En una realización particular, el componente (b) está fusionado al extremo amino terminal del componente (a).

El término “polipéptido de interés”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un polipéptido cualquiera, de cualquier tamaño, que sea de interés para el usuario, en donde la fusión al extremo amino del componente (i) no afecta la capacidad de la proteína de fusión de la invención de formar nanoesferas y/o microesferas. En una realización preferida, dicho polipéptido de interés puede ser un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental o un antígeno tumoral.

Antígenos virales adecuados como primer polipéptido de interés incluyen antígenos del VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humanos, (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos) o proteína temprana inmediata tales como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tales como gB o derivados de los mismos), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados de los mismos), virus de la varicela zóster (tales como gpl, II, III y IE63), o de un virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos de núcleo, E1, NS3 o NS5), de paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, de virus de la rubeola (tales como proteínas EI y E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humanos (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, eg LI, L2, EI, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células infectadas con virus influenza, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las

mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes de rotavirus), y similares.

Antígenos bacterianos adecuados como primer polipéptido de interés incluyen antígenos de

5 *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC y adhesinas); antígenos de *S. pyogenes* (tales como proteínas M o fragmentos de las mismas y proteasa C5A); antígenos de *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (tales como adhesinas e invasinas de alto y de bajo peso molecular);

10 antígenos de *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo *Parapertussis* y *B. bronchiseptica* (tal como pertactina, toxina de la tosferina o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias); antígenos de *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C, MPT

15 44, MPT59, MPT45, HSPIO, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD de 19kDa [Rv3763], PPD de 38kDa [Rv0934]); antígenos de *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar a la toxina Shiga o derivados de la misma);

20 antígenos de *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S.*

25 *choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivado de la misma); antígenos de *C.*

30 *botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivado de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas del clostridium A o B y derivados de las mismas); antígenos de *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por

35 ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. andersonfi* (por ejemplo OspA, OspC,

- DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana exterior poco comunes), antígenos de *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Toxoplasma spp.* y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *M. tuberculosis* (tales como Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c de 16 kDa, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1); antígenos de *Chlamydia* (tales como la proteína de alto peso molecular (HWMP), ORF3 (documento EP 366 412) y posibles proteínas de membrana (Pmp); antígenos de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina, el antígeno proteico neumolisina, y derivados detoxificados mutantes de los mismos); antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo); antígenos de *H. influenzae* no clasificable (tales como OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina, o variantes de múltiples copias o las proteínas de fusión de las mismas).
- Antígenos fúngicos adecuados como primer polipéptido de interés incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, componentes de antígeno fúngico de *Candida*; antígenos fúngicos de *Histoplasma* tales como proteína de choque térmico 60 (HSP60) y otros componentes de antígeno fúngico de *Histoplasma*; de *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; antígenos fúngicos de *Cryptococcus* tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígeno fúngico de *Cryptococcus*; antígenos fúngicos de coccidios tales como antígenos de esférula y otros componentes de antígeno fúngico de coccidios; antígenos de *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; de *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*; y antígenos fúngicos de *Tinea* tales como tricofitina y otros componentes de antígeno fúngico de coccidios.
- Antígenos protozoarios adecuados como primer polipéptido de interés incluyen, pero no se limitan a, antígenos de *Plasmodium spp.*, como *P. falciparum* y antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* (tales como RTS.S, TRAP, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*); así como antígenos de superficie de merozoitos, antígenos de superficie de esporozoitos, antígenos de circumsporozoitos, antígenos de superficie de gametocitos/gametos, antígeno de estadio en

sangre pf, 55/RESA y otros componentes de antígenos de plasmoides; antígenos de Toxoplasma tales como SAG-I, p30 y otros componentes de antígeno de Toxoplasma; antígenos de esquistosoma tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígeno de esquistosoma; el antígeno de *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; antígenos de *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; el antígeno de Leishmania y otros antígenos de Leishmania tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígeno de Leishmania; antígenos de Giardia spp., incluyendo *G. lamblia*; y antígenos de Trypanosoma cruzi tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígeno de Trypanosoma.

Alérgenos o antígenos medioambientales adecuados como primer polipéptido de interés incluyen, pero no se limitan a un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), alérgenos de la caspa y el pelo de animales, y alérgenos de la comida. Alérgenos del polen importantes de árboles, césped y hierbas se originan a partir de órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y Platanaceae incluyendo entre otros abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de Poales incluyendo entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de Asterales y Urticales incluyendo entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico de los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento por ejemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, los de mamíferos tales como gato, perro y caballo, pájaros, alérgenos de veneno incluyendo los que se originan de picaduras o mordeduras de insectos tales como los del orden taxonómico de Hymenoptera incluyendo abejas (superfamilia *Apidae*), avispas y hormigas (superfamilia *Formicoidae*). Todavía otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos por inhalación de hongos tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

Antígenos tumorales adecuados como primer polipéptido de interés incluyen, pero no se limitan a MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos antigénicos CAP-1 y CAP-2,

etv6, aml1, antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- ζ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p2lras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, β -catenina, 13-catenina, γ -catenina, p12Ocn, gp100Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa del cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p2lras), cáncer biliar (p2lras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma de cuello uterino (p53, p2lras), carcinoma de colon (p2lras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkins (Imp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p2lras, gp100Pme1117), mieloma (familia MUC, p2lras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (Imp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano), cáncer de testículos (NY-ESO-1) y leucemia de células T (epítomos del VLTH-1).

La proteína de fusión de la invención tiene la capacidad de formar nanoesferas y/o microesferas cuando se expresa en una célula, independientemente, de tener un componente de interés unido a la secuencia de reconocimiento de una sortasa. Así, la presente invención también contempla la formación de nanoesferas y/o microesferas por la proteína de fusión de

la invención en donde dichas proteínas no comprenden un componente de interés unido a la secuencia de reconocimiento de una sortasa, y la posterior modificación de dichas nanoesferas y/o microesferas a través de la adición de un componente de interés a la secuencia de reconocimiento de una sortasa.

5

Así, en una realización particular de la nanoesfera/microesfera de la invención, la proteína de fusión de la invención comprende además un componente de interés unido covalentemente a la parte residual del motivo de reconocimiento de una sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa.

10

Como es obvio para el experto en la técnica, la modificación de la nanoesfera o microesfera por la sortasa produce un intermediario en donde la proteína de fusión de la invención que forma la nanoesfera o microesfera está modificada por escisión del motivo de reconocimiento de la sortasa. Así, en una realización particular, la nanoesfera/microesfera de la invención es modificada por la acción de una sortasa que reconoce el motivo de reconocimiento de la sortasa y escinde dicho motivo de reconocimiento. En otra realización particular, la nanoesfera/microesfera de la invención es modificada por la acción de una sortasa que reconoce el motivo de reconocimiento de la sortasa y escinde dicho motivo de reconocimiento de la sortasa, en donde el motivo de reconocimiento de la sortasa es la secuencia de aminoácidos LPXTG (SEQ ID NO: 22), en donde X es cualquier aminoácido, y en donde la sortasa escinde entre el T y G del motivo de reconocimiento de la sortasa.

15

20

En otra realización particular de la nanoesfera/microesfera de la invención, el componente de interés se selecciona del grupo que consiste en:

25

- Ligandos de receptor de tipo Toll (TLR de "Toll-Like Receptors");
- Monofosforil lípido A (MPL A);
- oligonucleótidos seleccionados de islas CpG y ácido polinosínico:polidifílico (poly(I:C) – número CAS: 24939-03-5);
- saponina;
- moléculas lipídicas;
- moléculas de recubrimiento seleccionadas de un grupo que consiste en: poligliceroles, polietilenglicol, quitosanos, poli(oxazolinas) (POX), poli(hidroxipropil metacrilato) (PHPMA), poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA), poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (HPMA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(N,N-dimetil acrilamida) (PDMA) y poli(N-acriloilmorfolina) (PAcM);
- oligosacáridos;

30

35

- anticuerpos;
- nanoanticuerpos;
- afitinas;
- antígeno viral;
- antígeno bacteriano;
- antígeno fúngico;
- alérgeno;
- antígeno medioambiental; y
- un antígeno tumoral.

5

10

El término “ligandos de Receptor de tipo Toll” o “TLR” del acrónimo inglés “*receptor like toll*” tal como se usa en la presente invención hace referencia a moléculas que tiene la capacidad de unión con una proteína de la familia de proteínas de receptor de tipo Toll. Los TLR constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato. Estos receptores son transmembranosos y reconocen patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos, y estimulan una variedad de respuestas inflamatorias.

15

20

El término “Monofosforil lípido A” o el acrónimo “MPL A” referente al nombre en inglés, tal como se usa aquí hace referencia a una molécula derivada de lipopolisacárido (LPS), o endotoxina, que é altamente inmunoestimulador y con baja toxicidad por lo que se utiliza como adyuvante de vacunas.

25

El término “oligonucleótidos” tal como se usa aquí, hace referencia a una secuencia de ADN o ARN, de cadena simple o dupla, con cincuenta pares de bases o menos, en donde las bases son naturales, adenina, citosina, guanina, timina y uracilo, o sintéticas, y en donde el oligonucleótido puede contener modificaciones, tales como, sin limitación, metilación (ejemplo 5-metil-citosina), fosforilación, glicosilación, oxidación, etc.

30

35

El término “saponina” tal como se usa en la presente invención hace referencia a glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Las saponinas son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea.

El término “moléculas lipídicas” tal como se usa en la presente descripción hace referencia a sustancias grasas insolubles en agua que incluyen grasas, aceites, ceras y compuestos relacionados.

5

La expresión “moléculas de recubrimiento” tal como se usa en la presente invención hace referencia a cualquier componente químico que se puede utilizar para el revestimiento de las nanoesferas/microesferas.

10 El término “oligosacáridos” en el presente contexto hace referencia a moléculas constituidas por la unión covalente de 2 a 10 monosacáridos cíclicos, de 3 en adelante pueden ser lineales o ramificados mediante enlaces de tipo glucosídicos, enlace covalente que se establece entre grupos alcohol de dos monosacáridos, con desprendimiento de una molécula de agua.

15 El término “anticuerpo” (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

20 Las regiones constantes de los anticuerpos (Abs) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), polipéptidos similares a anticuerpos, como anticuerpos quiméricos y anticuerpos
25 humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida.

El término “nanoanticuerpos”, también llamados nanobodies, anticuerpos de dominio simple
30 o anticuerpos VHH, en el contexto de la presente invención son un tipo de anticuerpos derivados de camélidos, siendo mucho más pequeños que los habituales, que son gigantes para los estándares moleculares, ya que cada uno de ellos es un conglomerado de dos cadenas pesadas y dos ligeras, plegados de manera intrincada y ligados a azúcares complejos, mientras que los nanoanticuerpos son proteínas relativamente sencillas con un
35 tamaño aproximado de un décimo del tamaño del correspondiente en los humanos y de apenas unos nanómetros de longitud.

El término “afitina” tal como se usa en la presente invención hace referencia a proteínas artificiales con la capacidad de unirse selectivamente a antígenos.

5 Las nanoesferas/microesferas de la invención pueden tener variadas utilidades, tales como, sin cualquier limitación, vehículos de entrega de medicamentos, vehículos para la expresión y purificación de proteínas, agentes inmunogénicos, etc. Esto es posible debido a las variadas posibilidades de modificación y alteraciones que se presentan tanto en la proteína de fusión como en las nanoesferas y microesferas.

10

En una realización particular el componente de interés comprende además una secuencia de reconocimiento por proteasas localizada en la región C-terminal del motivo aceptador de sortasa que caracteriza el componente de interés. Secuencias de reconocimiento de proteasas se han definido anteriormente y dichas definiciones y realizaciones particulares son
15 igualmente válidas para la presente realización.

15

En una realización particular el componente de interés comprende además un péptido señal de la vía secretora localizado en la región C-terminal del motivo aceptador de sortasa que caracteriza el componente de interés. Péptidos señal de la vía secretora se han definido
20 anteriormente y dichas definiciones y realizaciones particulares son igualmente válidas para la presente realización.

20

En una realización particular el componente de interés comprende además una etiqueta para facilitar su purificación localizada en la región C-terminal del motivo aceptador de sortasa que
25 caracteriza el componente de interés. Etiquetas para facilitar la purificación se han definido anteriormente y dichas definiciones y realizaciones particulares son igualmente válidas para la presente realización.

25

En una realización particular de las nanoesferas y/o microesferas el primer polipéptido de
30 interés, el componente de interés, y/o el segundo polipéptido de interés es la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP) o una variante funcionalmente equivalente.

30

El término “glucosa-6-fosfatasa 2” o “IGRP” o “proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islotes”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una
35 proteína capaz de hidrolizar glucosa-6-fosfato para dar glucosa y fosfato. Es una proteína transmembrana que se expresa en páncreas y en menor medida en los testículos. En

35

humanos está codificada por el gen G6PC2. La proteína IGRP puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la proteína IGRP es la proteína humana identificada por el número de acceso Q9NQR9 en la base de datos de UniprotKB (Versión de la entrada 147, 14 diciembre 2022, versión de la

5 secuencia 1, 1 de octubre de 2000). En humanos existen tres isoformas de la proteína, identificadas por los siguientes números de acceso de UniprotKB:

- Isoforma 1, considerada como la secuencia canónica, tiene una longitud de 355 aminoácidos: Q9NQR9-1.
- Isoforma 2, con una longitud de 102 aminoácidos: Q9NQR9-2.

10 - Isoforma 3, con una longitud de 154 aminoácidos: Q9NQR9-3.

En otra realización particular, la proteína IGRP es la proteína de ratón identificada por el número de acceso Q9Z186 en la base de datos de UniprotKB (Versión de la entrada 145, 14 de diciembre de 2022; versión de la secuencia 1, 1 de mayo de 1999). En ratón existen dos

15 isoformas de la proteína, identificadas por los siguientes números de acceso de UniprotKB:

- Isoforma 1, considerada la secuencia canónica, con una longitud de 355 aminoácidos: Q9Z186-1.
- Isoforma 2, con una longitud de 154 aminoácidos: Q9Z186-2.

20 Estas isoformas así como cualquier otra isoforma de la proteína IGRP de cualquier origen se consideran incluidas dentro del término "IGRP" de acuerdo con la presente invención.

En otra realización particular, la proteína IGRP es la proteína de rata codificada por el gen identificado por el número de acceso Gene ID 681817 en la base de datos de NCBI Genbank

25 (versión del 24 de abril 2022).

El término "variante funcionalmente equivalente", tal y como aquí se utiliza, en referencia a la proteína IGRP, se refiere a cualquier péptido o proteína que resulta de la delección, inserción, adición o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos con respecto a la secuencia de

30 la que deriva y que conserva la función de dicha secuencia.

En una realización particular, la variante funcionalmente equivalente tiene una identidad de secuencia de al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al

35 menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% en toda su longitud con la secuencia de la proteína IGRP.

Como es obvio para el experto en el arte, no hay ninguna limitación en la composición de las nanoesferas/microesferas con relación a que puedan incluir uno o más del primer polipéptido de interés, el componente de interés, y el segundo polipéptido de interés.

5

Así en una realización particular las nanoesferas y/o microesferas de la invención comprenden el polipéptido de interés y/o el componente de interés. En otra realización particular el polipéptido de interés es idéntico o distinto al componente de interés.

10 Asimismo, en una realización particular de las nanoesferas y/o microesferas de la invención las nanoesferas/microesferas de la invención son bivalentes o trivalentes.

El término “nanoesferas/microesferas bivalentes” tal como se usa en la presente descripción hace referencia a que las nanoesferas y/o microesferas comprenden al menos dos
15 compuestos/moléculas/proteínas distintos de entre el primer polipéptido de interés, el componente de interés, y el segundo polipéptido de interés. De igual modo, el término “nanoesferas/microesferas trivalentes” tal como se usa en la presente descripción hace referencia a que las nanoesferas y/o microesferas comprenden al menos tres
20 compuestos/moléculas/proteínas distintos de entre el primer polipéptido de interés, el componente de interés, y el segundo polipéptido de interés.

Polinucleótidos, vectores y célula huésped de la invención

Todas las definiciones y realizaciones particulares anteriormente descritas en relación con
25 otros aspectos de la presente invención son igualmente aplicables a los presentes aspectos y sus realizaciones particulares.

La proteína de fusión de la invención puede ser codificada por un polinucleótido. Así, otro aspecto de la presente invención hace referencia a un polinucleótido que codifica una proteína
30 de fusión de la invención, de ahora en adelante el polinucleótido de la invención.

El término “polinucleótido”, según se usa en la presente invención, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen
35 monómeros modificados mediante metilación así como formas no modificadas. Los términos

"polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente invención e incluyen mRNA, cDNA y polinucleótidos recombinantes.

Dicho polinucleótido puede ser parte de un casete de expresión, la cual se usa para, sin limitarse, expresar dicho polinucleótido en una célula. Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a un casete de expresión que comprende un polinucleótido según la invención, de ahora en adelante el casete de la invención.

El término "casete de expresión", tal y como aquí se utiliza, se refiere a un polinucleótido que comprende un gen y un promotor adecuado para controlar ese gen. El casete de expresión puede opcionalmente incluir otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. La elección de un promotor y otro/s elemento/s regulatorios generalmente varía en función de la célula huésped utilizada. Promotores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen promotores constitutivos que promueven la expresión de las secuencias asociadas a ellas de forma constante y promotores inducibles, que requieren de un estímulo externo para promover la transcripción de las secuencias asociadas a ellos.

Promotores útiles para la realización de la presente invención incluyen:

- Promotores constitutivos como por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), el promotor del factor de elongación 1 alfa (TEF) y el promotor del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (TPI), el promotor de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (GPK), el promotor MRP7.
- Promotores inducibles como por ejemplo el promotor de la metalotioneína (CUP1) cuya expresión se regula mediante adición de cobre al medio de cultivo, el promotor del gen que codifica el gen FUS1 o el gen FUS2, cuya expresión se activa en presencia de feromonas (el factor α), el promotor TET cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1-10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, el promotor de la fosfatasa (PH05) cuya expresión se activa en presencia de fosfato y el promotor de la proteína de choque térmico HSP150, cuya expresión se activa a elevada temperatura.

En una realización particular de la casete de expresión de la invención, la casete comprende un primer y un segundo polinucleótido, en donde el segundo polinucleótido codifica para una segunda proteína de fusión. En otra realización particular el polinucleótido de la invención o la casete de expresión de la invención están unidos operativamente a un primer promotor y el

segundo polinucleótido está unido operativamente a un segundo promotor. En otra realización particular el primer y el segundo promotor son el mismo promotor o son distintos promotores.

En una realización particular, cuando la célula en la que se va a expresar el polinucleótido de la invención es una bacteria, dicho promotor es el sistema promotor beta-lactamasa y lactosa, el promotor T7 ARN polimerasa, el promotor lambda, el promotor trp o el promotor tac. En una realización más particular de la invención, dicho promotor es un promotor inducible. En otra realización más particular, dicho promotor es un promotor inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). En una realización aún más particular, el promotor inducible por IPTG es el promotor T7 ARN polimerasa.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende el polinucleótido o el casete de expresión de la invención, de ahora en adelante el vector de la invención.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias necesarias para que después de transcribir y traducir dichas secuencias en una célula se genere la proteína de fusión de la invención. Dicha secuencia está unida operativamente a segmentos adicionales que proporcionan su replicación autónoma en una célula huésped de interés. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión, que se define como un vector, que además de las regiones de la replicación autónoma en una célula hospedadora, contiene regiones operativamente ligadas al polinucleótido de la invención y que son capaces de potenciar la expresión de los productos del polinucleótido según la invención. Los vectores de la invención se pueden obtener por medio de técnicas ampliamente conocidas en la técnica. En una realización particular de la invención el vector de la invención es un vector de expresión en bacterias. En otra realización particular de la invención, cuando el organismo es procariota, tal como una bacteria, vectores adecuados según la invención son, por ejemplo, los vectores pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, pNH8A, pNH16a, pNH18a. En una realización particular de la invención, cuando dicha bacteria es *E. coli*, dicho vector es el plásmido pET, en particular, el plásmido pET Duet-1. Dicho plásmido comprende dos sitios de clonaje múltiple (MSC, del inglés "multiple cloning sites") diferentes. Los genes clonados en dicho plásmido se transcriben bajo el control del promotor del bacteriófago T7, cuando se activa la T7 ARN polimerasa en la célula huésped. La expresión se induce con IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), el cual retira al represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción y se promueva la expresión de la proteína de interés.

En una realización particular, el vector de la invención comprende además un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende los aminoácidos 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - 5 - un polipéptido que comprende los aminoácidos 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene la capacidad de incorporarse en nanoesferas y microesferas.
- 10 Los distintos polinucleótidos que codifican los distintos componentes de la invención pueden ser expresados a partir de distintos vectores. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con una composición de vectores, de ahora en adelante la composición de vectores de la invención, que comprende el vector de la invención y un segundo vector que comprende un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene
 - 20 la capacidad de incorporarse a nanoesferas.

Tal como en el caso de uno solo vector, los polinucleótidos en la composición de vectores también pueden estar unidos operacionalmente a promotores. En una realización particular de la composición de vectores de la invención, el polinucleótido de la invención o la casete de expresión de la invención están unidos operativamente a un primer promotor y el segundo polinucleótido está unido operativamente a un segundo promotor. En otra realización particular el primer y el segundo promotor son el mismo promotor o son distintos promotores. En una realización particular de la invención los vectores de la composición de vectores de la invención son vectores de expresión en bacterias. Tal como será obvio para el experto en la técnica, los ejemplos, definiciones y realizaciones particulares descritos para el vector de la invención son igualmente válidos para los vectores de la composición de vectores.

El polinucleótido de la invención, la casete de expresión, el vector o la composición de vectores de la invención pueden estar comprendidos en una célula huésped. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende una proteína de fusión de la

invención, un polinucleótido de la invención, un casete de expresión de la invención, vector o composición de vectores de la invención, de ahora en adelante la célula de la invención.

La célula de la invención puede ser cualquier célula procariota o cualquier célula eucariota.

- 5 En la presente invención puede usarse prácticamente cualquier tipo celular. Cualquier célula huésped que pueda ser transformada con el polinucleótido de la invención, o que pueda ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante que contenga el polinucleótido de la invención, por ejemplo células animales (tal como células de mamífero, células de aves, células de insecto, etc.), células de plantas, levaduras, bacterias etc. Las
10 células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia.

Métodos de la invención

- 15 Todas las definiciones y realizaciones particulares anteriormente descritas en relación con otros aspectos de la presente invención son igualmente aplicables a los presentes aspectos y sus realizaciones particulares.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para producir una proteína de fusión de la invención, de ahora en adelante el método I de la invención, que comprende:

- 20 (a) expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión,
(b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas, y
(c) concentrar las nanoesferas y/o microesferas.

25

La primera etapa del método para producir la proteína de fusión de la invención comprende expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión.

- Para expresar el primer polinucleótido en una célula es necesario, como sabe el experto en la
30 materia, introducir en la célula el polinucleótido, por ejemplo, mediante la transformación de dicha célula con un vector que comprende el polinucleótido. En el caso de que el polinucleótido esté operativamente unido a un promotor inducible, para expresar dicho polinucleótido será necesario poner en contacto la célula con el inductor. En el caso particular de que el promotor sea inducible por IPTG, en el caso de células bacterianas, para la expresión del polinucleótido
35 se añade IPTG al cultivo bacteriano durante el tiempo necesario hasta conseguir la expresión del polinucleótido, por ejemplo al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al

menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas o más. Preferiblemente, la inducción con IPTG se hace durante un periodo de tiempo aproximado de 3 horas. En una realización particular, durante la inducción se incuban las células a una temperatura de entre 18 y 37°C, preferiblemente entre 25 y 37°C, más preferiblemente 37°C. En una realización particular, cuando el tiempo de inducción es de más de 24 horas, durante la inducción se incuban las células a una temperatura de entre 18 y 25°C. Una vez finalizada la inducción, las bacterias se recogen por centrifugación.

La segunda etapa del método de producción de la proteína de fusión de la invención consiste en someter a las células a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas.

Las condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas pueden ser determinadas por el experto en la materia para cada tipo celular. Métodos adecuados para detectar la formación de nanoesferas y/o microesferas incluyen, pero no se limitan al método descrito en el Ejemplo 1 de la solicitud de patente WO 2011/098652, en donde se detecta la formación de nanoesferas/microesferas (inclusiones) mediante microscopía por inmunofluorescencia indirecta empleando anticuerpos policlonales frente a muNS. En una realización particular, las condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas comprenden incubar las células que expresan el primer polinucleótido durante un periodo de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 24 horas, y a una temperatura de entre 25 y 37°C, preferiblemente 37°C.

En una realización particular del método I de la invención, la célula es una célula bacteriana o una célula eucariota, en donde si es una célula bacteriana se forman nanoesferas en el paso (b) y si es una célula eucariota se forman microesferas en el paso (b).

La primera y la segunda etapa del método para producir la proteína de fusión de la invención se pueden llevar a cabo de forma simultánea o bien de forma secuencial, de modo que primero se lleva cabo la expresión del primer polinucleótido y a continuación se someten las células a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas. En una realización particular, la primera y segunda etapa se llevan a cabo de forma simultánea, puesto que las condiciones a las que se someten las células para la expresión del primer y segundo polinucleótido son adecuadas para la formación de microesferas. En una realización

más particular, dichas condiciones comprenden incubar las células en presencia del inductor, preferiblemente IPTG, durante un periodo de tiempo de al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 24 horas, y a una temperatura de entre 25 y 37°C, preferiblemente 37°C.

La tercera etapa del método I consiste en concentrar las nanoesferas y/o microesferas. Para concentrar las nanoesferas/microesferas es necesario lisar las células en las que se han formado las nanoesferas/microesferas mediante cualquier método, como la incubación con un tampón de lisis o la sonicación, entre otros. Posteriormente, las nanoesferas/microesferas se pueden sedimentar mediante centrifugación, preferiblemente a una velocidad de aproximadamente 2700g. En una realización particular, una vez lisadas las células las nanoesferas/microesferas se lavan con un tampón que comprende un catión divalente. El término “catión divalente”, según se usa en la presente invención, se refiere a un ion cargado positivamente de cualquier metal de la tabla periódica que tenga una valencia de 2. Cationes divalentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, los cationes divalentes de Mg, Cd, Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr y Zn. En una forma preferida de realización, el catión divalente es Mg^{2+} . Concentraciones adecuadas de catión divalente para inducir la formación de agregados de la proteína muNS son, por ejemplo, al menos 0,5 mM, al menos 0,8 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 15 mM, al menos 20 mM o superiores. En una realización particular, las nanoesferas y/o microesferas se lavan con un tampón que comprende Mg^{2+} , por ejemplo $MgCl_2$, preferiblemente a una concentración de 5 mM. En una realización aún más particular, las nanoesferas y/o microesferas se concentran siguiendo el protocolo de purificación que se indica en los ejemplos del presente documento.

En una realización particular, el método I de la invención comprende además purificar la proteína de fusión separándola de las nanoesferas y/o microesferas.

Con el fin de separar la proteína de fusión de las nanoesferas y/o microesferas es preciso someterlas a condiciones que conducen a su desintegración. Así, en una realización particular, el método I de la invención comprende además purificar la proteína de fusión separándola de las nanoesferas y/o microesferas, sometiendo para ello a las nanoesferas y/o microesferas a condiciones que conducen a su desintegración.

Las condiciones que conducen a la desintegración de las nanoesferas y/o microesferas incluyen, entre otras:

- incubación de las nanoesferas y/o microesferas con agentes desnaturalizantes, por ejemplo, urea o hidrocloreuro de guanidinio,
- incubación de las nanoesferas y/o microesferas con detergentes iónicos, por ejemplo SDS a alta concentración,
- incubación con NaCl a concentraciones superiores a 500 mM,
- incubación con un tampón que no comprende cationes divalentes, preferiblemente que no comprende Mg^{2+} .

En una realización particular, las condiciones que conducen a la desintegración de las nanoesferas y/o microesferas son la incubación con un tampón que no comprende cationes divalentes, preferiblemente que no comprende Mg^{2+} .

En una realización particular, una vez desintegradas las nanoesferas y/o microesferas, la proteína de fusión se puede purificar mediante cualquier método conocido. Dicho método dependerá de la naturaleza del polipéptido de interés y será conocido por el experto en la materia. Las técnicas de purificación de polipéptidos son ampliamente conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, inmunoprecipitación, etc.

Las nanoesfera/microesfera de la invención además de poder ser modificada por una sortasa e incorporar un componente de interés a la proteína de fusión de la invención, puede ser usada como plataforma para la incorporación de una segunda proteína de fusión que comprende la región IC de la proteína muNS de Ortoreovirus. Esto permite que la nanoesfera/microesfera de la invención se pueda usar para producir proteínas utilizando dicha segunda proteína de fusión.

Así, otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para producir una proteína, de ahora en adelante el método II de la invención, que comprende:

- (a) expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica una proteína de fusión de la invención y un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión que comprende:

- (i) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,

- un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas y/o microesferas, y
 - (ii) un segundo polipéptido de interés,
- en donde el componente (ii) es la proteína producida;
- (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas o microesferas, y
 - (c) concentrar las nanoesferas o microesferas.

En una realización particular el método II de la invención comprende purificar la proteína de fusión separándola de las nanoesferas o microesferas.

- En una realización particular el método II de la invención el componente (ii) está fusionado al extremo amino del componente (i) o al extremo carboxilo del componente (i).

Como comprenderá el experto en la materia, podrá ser de utilidad la separación del componente (ii) del componente (i) en el método II de la invención. Una posibilidad para poder separar dichos componentes es el uso de un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación de los dos componentes.

En una realización particular el método II de la invención la segunda proteína de fusión comprende una secuencia de reconocimiento por una proteasa entre sus componentes (i) y (ii).

El término “proteasa”, o “peptidasas”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas, utilizando para eso una molécula de agua, por lo que se clasifican como hidrolasas. Ejemplos de sitios de corte de proteasas adecuados para incorporación en la proteína de fusión de la invención, sin limitación, incluyen enteroquinasa (sitio de corte DDDDK; SEQ ID NO: 5), factor Xa (sitio de corte IEDGR; SEQ ID NO: 6), trombina (sitio de corte LVPRGS; SEQ ID NO: 7), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG; SEQ ID NO: 8), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP; SEQ ID NO: 9), inteínas y similares. En una realización particular la secuencia de reconocimiento por proteasas es una secuencia de reconocimiento por enteroquinasa o una secuencia de reconocimiento por factor Xa.

En una realización particular del método II de la invención la segunda proteína de fusión comprende una secuencia de reconocimiento por una proteasa entre sus componentes (i) y (ii), y el método II de la invención comprende además una etapa de separar la proteína producida del componente (i) de la segunda proteína de fusión a través de la incubación de la segunda proteína con una proteasa en condiciones que conducen a la escisión de la secuencia de reconocimiento por la proteasa.

En otra realización particular, el método II de la invención comprende además purificar la proteína de fusión separándola de las nanoesferas y/o microesferas sometiendo a las nanoesferas y/o microesferas a condiciones que conducen a su desintegración.

En otra realización particular del método II de la invención, la célula es una célula bacteriana o una célula eucariota, en donde si es una célula bacteriana se forman nanoesferas en el paso (b) y si es una célula eucariota se forman microesferas en el paso (b).

En otra realización particular del método II de la invención la proteína es la proteína IGRP.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para producir un primer polipéptido de interés, de ahora en adelante el método III de la invención, en donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) producir la proteína de fusión de la invención por el método I de la invención, en donde la proteína de fusión comprende:
 - un componente (iii) fusionado al extremo amino del componente (i), en donde el componente (iii) es el polipéptido de interés y
 - una secuencia de reconocimiento por una proteasa entre sus componentes (i) y (iii),
- (b) someter a las nanoesferas y/o microesferas a condiciones que conducen a su desintegración, produciéndose la separación de la proteína de fusión y las nanoesferas o microesferas,
- (c) poner en contacto el producto resultante de la etapa (b) con una proteasa específica para la secuencia de reconocimiento que conecta los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión bajo condiciones adecuadas para la proteólisis de dicha proteína de fusión, con la consiguiente separación de los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión,

- (d) someter el producto de la etapa (c) a condiciones adecuadas para la formación de las nanoesferas o microesferas y
- (e) separar las nanoesferas o microesferas del componente (iii).

5 En una realización particular, la secuencia de reconocimiento por una proteasa que une los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión es una secuencia de reconocimiento por enteroquinasa (sitio de corte DDDDK- SEQ ID NO: 5), factor Xa (sitio de corte IEDGR- SEQ ID NO: 6), trombina (sitio de corte LVPRGS- SEQ ID NO: 7), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG - SEQ ID NO: 8), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP – SEQ ID NO: 9), inteínas o similares. En una realización más particular, la secuencia de reconocimiento por proteasas es una secuencia de reconocimiento por enteroquinasa o una secuencia de reconocimiento por factor Xa. En una realización aún más particular, la secuencia de reconocimiento por proteasas es la secuencia de SEQ ID NO: 5 o la secuencia de SEQ ID NO: 6.

15 Las condiciones adecuadas para la proteólisis de la proteína de fusión comprenden poner en contacto la proteína de fusión con la proteasa específica para la secuencia de reconocimiento que conecta los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión bajo condiciones de pH, temperatura, etc. que dependerán de la proteasa concreta a utilizar. El experto en la materia sabe determinar estas condiciones para cada proteasa particular.

20 Las condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas y/o microesferas incluyen poner en contacto el producto resultante de la etapa (a) con un tampón que contiene un catión divalente, tal y como se ha descrito previamente. En una forma preferida de realización, el catión divalente es Mg^{2+} . Concentraciones adecuadas de catión divalente para inducir la formación de agregados de la proteína muNS son, por ejemplo, al menos 0,01 mM, al menos 0,1 mM, al menos 1 mM, al menos 2 mM, al menos 3 mM, al menos 4 mM, al menos 5 mM o superiores. En una realización particular, dichas condiciones comprenden la incubación con un tampón que comprende Mg^{2+} , preferiblemente a una concentración de 5 mM.

30 De acuerdo al presente método, cuando las nanoesferas y/o microesferas se vuelven a formar el componente (i) de la proteína de fusión se integra de nuevo en dichas nanoesferas y/o microesferas, quedando libre el componente (iii) de la proteína de fusión. Por tanto, este es un método adecuado para la purificación de proteínas.

35

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con una proteína obtenible según el método I, II o III de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para producir una nanoesfera o microesfera de la invención, de ahora en adelante el método IV de la invención, que comprende las etapas de:

- (a) producir la proteína de fusión por el método I de la invención, y
- (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas o microesferas.

En una realización particular del método IV de la invención la célula es una célula bacteriana o una célula eucariota, en donde si es una célula bacteriana se forman nanoesferas en el paso (b) y si es una célula eucariota se forman microesferas en el paso (b).

Las condiciones de incubación de las nanoesferas o microesferas en presencia de una sortasa son conocidas del experto de la técnica.

En una realización particular, el método IV de la invención comprende además la etapa de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa que reconoce el motivo de reconocimiento y un sustrato que comprende un motivo aceptador de sortasa, obteniéndose una nanoesfera y/o microesfera que comprende el sustrato que comprende el motivo aceptador de sortasa.

En una realización particular del método IV de la invención la sortasa es sortasa A, el motivo de reconocimiento es la secuencia SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23 y la etiqueta es una secuencia de poliglicina, preferiblemente la secuencia GGG.

En una realización particular del método IV de la invención la etapa de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa se realiza en la presencia de un exceso de iones de calcio (Ca^{2+}) y en la ausencia de grupos fosfato (PO_4^{3-}). En otra realización particular del método IV de la invención, la etapa de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa se realiza a un pH de entre 6,5 a 8,5, preferiblemente a un pH de 7,5, a una temperatura de entre 35°C a 38°C, preferiblemente 37°C, durante 3 horas (h) a 5 h, preferiblemente 4 h.

En otra realización particular del método IV de la invención, la etapa de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa se realiza en presencia de un exceso de iones de calcio y la ausencia de grupos fostato a un pH de 7,5 durante 4h.

- 5 En otra realización particular del método IV de la invención, la reacción durante la etapa de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa se detiene con la adición de un exceso de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Número CAS: 60-00-4).

- 10 Otra realización particular del método IV de la invención se purifican las nanoesferas o microesferas entre la etapa (b) y de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa.

Composiciones farmacéuticas

- 15 Todas las definiciones y realizaciones particulares anteriormente descritas en relación con otros aspectos de la presente invención son igualmente aplicables a los presentes aspectos y sus realizaciones particulares.

- 20 La proteína de fusión de la invención y la nanoesfera o microesfera de la invención se pueden usar para desarrollar composiciones farmacéuticas y en usos terapéuticos.

- 25 Así, otro aspecto de la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o composición inmunogénica, de ahora en adelante la composición farmacéutica de la invención o la composición inmunogénica de la invención, que comprende la nanoesfera y/o microesfera de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 30 El término "composición inmunogénica" se refiere a una composición que es capaz de provocar, establecer o inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, sea una respuesta inmunitaria celular o mediada por anticuerpos, a la composición tras su administración. Una "composición inmunogénica" comprende moléculas con propiedades antigénicas, como bacterias o virus muertos o atenuados, y también polipéptidos inmunogénicos. Un polipéptido inmunogénico se denomina generalmente antigénico. Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígenos del sistema inmunitario, como una inmunoglobulina (anticuerpo) o un receptor de antígenos de células T. Debe entenderse que, en la presente invención, la composición inmunogénica
- 35

de la invención comprende como la proteína de fusión de la invención y opcionalmente las nanoesferas o microesferas de la invención.

5 Como será evidente para el experto en la técnica, una vacuna es una composición inmunogénica. Así, en una realización particular, la composición inmunogénica es una vacuna o composición de vacuna. El término "vacuna" o "composición de vacuna", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición inmunogénica que es capaz de provocar, establecer, inducir o mejorar una respuesta inmunitaria frente a una enfermedad particular, en donde dicha respuesta inmunitaria es de tipo celular o mediada por anticuerpos, 10 tras la administración al sujeto que es protectora. Una vacuna o composición vacunal suele contener un agente que se asemeja a un microorganismo causante de la enfermedad o a una parte del mismo (por ejemplo, un polipéptido). Las vacunas o composiciones vacunales pueden ser profilácticas o terapéuticas. El término "composición vacunal", tal y como también se utiliza aquí, se refiere a una composición inmunogénica de la invención complementada 15 con excipientes portadores farmacéuticamente aceptables, que cuando se administra a un sujeto, provoca, o es capaz de provocar directa o indirectamente, una respuesta inmunitaria en el huésped o sujeto que es protectora frente al microorganismo causante de la enfermedad.

Se entiende por "excipiente farmacéuticamente aceptable" una sustancia terapéuticamente 20 inactiva que se usa para incorporar el ingrediente activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que la fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. El excipiente o vehículo también incluye cualquier sustancia que sirva para mejorar la administración y la efectividad del 25 principio activo dentro de la composición farmacéutica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos 30 farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o la eficacia de las microesferas o de las composiciones que forman parte de las composiciones farmacéuticas. Ejemplos de vehículos apropiados se conocen bien en la bibliografía (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 35 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). En algunos casos, puede agregarse un desintegrante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o alginato de

sodio. El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de dosificación deseada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos por los expertos en la técnica (Faulí y Trillo C. (1993) "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid).

5

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada, tal como oral, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular.

Usos médicos

10

Todas las definiciones y realizaciones particulares anteriormente descritas en relación con otros aspectos de la presente invención son igualmente aplicables a los presentes aspectos y sus realizaciones particulares.

15 Como será evidente para el experto en la técnica, la proteína de fusión y/o las nanoesferas o microesferas tienen uso en medicina. Así, otro aspecto de la invención se relaciona con las nanoesferas y/o microesferas de la invención para su uso en medicina.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con las nanoesferas y/o microesferas de la invención o la composición inmunogénica de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de la lengua azul, de ahora en adelante el primer uso médico de la invención, en donde las proteínas de fusión que comprende la nanoesfera/microesfera se caracterizan por comprender al menos uno de:

- la proteína exterior de la cápside 2 (VP2) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- la proteína del núcleo 7 (VP7) del virus de la lengua azul 10 (BTV);
- la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- una proteína con una secuencia funcionalmente equivalente a cualquiera de las anteriores.

30 El término "lengua azul" o "fiebre catarral ovina" es una enfermedad vírica no contagiosa que afecta a los rumiantes domésticos y salvajes (principalmente a las ovejas, pero también a los bovinos, las cabras, los búfalos, los antílopes, los ciervos o los alces) y que es transmitida por los mosquitos de la especie Culicoides. El virus que causa la lengua azul, virus de la lengua azul (BTV acrónimo derivado del inglés *Bluetongue Virus*) se identifica como un miembro del género Orbivirus de la familia Reoviridae. La especie del virus de la lengua azul, o serogrupo, engloba 24 serotipos conocidos y otros atípicos recientemente descritos. La infección por el

35

virus de la lengua azul (VLA) puede ser inapreciable en muchos animales, pero también puede causar una enfermedad mortal en una proporción de rumiantes infectados. La gravedad de la enfermedad varía entre las distintas especies y cepas, siendo los síntomas más graves en las ovejas, que provocan la muerte, la pérdida de peso y la alteración del crecimiento de la lana.

- 5 En las ovejas muy susceptibles, la morbilidad puede llegar al 100%, en cuanto la mortalidad oscila entre el 2 y el 30%, pero puede llegar al 70%.

El término “proteína exterior de la cápside 2” o “VP2”, tal y como se usa aquí, hace referencia a una de las dos proteínas (con la VP5) que constituyen la cápside externa de la partícula vírica del BTV. LA VP2 es la principal partícula inmunogénica principal del BTV. VP2 es responsable de la adhesión viral a la célula huésped diana, probablemente por unión al ácido siálico. Esta unión induce la internalización del virión predominantemente por endocitosis dependiente de clatrina. En una realización particular del tratamiento de lengua azul de la invención, la proteína exterior de la cápside 2 del BTV4 comprende la secuencia identificada por el número de acceso P12434 en la base de datos de UniprotKB (Versión de la entrada 70, 14 de diciembre de 2022; versión de la secuencia 2, 1 de noviembre de 1991).

El término “proteína del núcleo 7” o “VP7”, tal y como se usa aquí, hace referencia a una de las proteínas del núcleo de BTV, la cual es accesible desde la superficie de un virus intacto. VP7 parece ser importante para las interacciones del virus con las células de los insectos. En una realización particular del tratamiento de lengua azul de la invención, la proteína del núcleo 7 del BTV4 comprende la secuencia identificada por el número de acceso P69361 en la base de datos de UniprotKB (Versión de la entrada 77, 14 de diciembre de 2022; versión de la secuencia 1, 3 de marzo de 2005).

El término “proteína no estructural 1” o “NS1”, tal y como se usa aquí, hace referencia a un regulador positivo de la síntesis proteica viral. En una realización particular del tratamiento de lengua azul de la invención, la proteína del núcleo 7 del BTV4 comprende la secuencia identificada por el número de acceso Q1W9P8 en la base de datos de UniprotKB (Versión de la entrada 16, 14 de diciembre de 2022; versión de la secuencia 1, 2 de mayo de 2006).

En el caso del primer uso médico de la invención, la expresión “secuencia funcionalmente equivalente” se refiere a que las variantes de las proteínas VP2, VP7 o NS1 mantienen totalmente o parcialmente su capacidad de funcionar como polipéptidos inmunogénicos, tal como descrito anteriormente.

Las variantes funcionalmente equivalentes de la proteína VP2, VP7 o NS1 incluyen aquellas que muestran al menos un al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de las que derivan.

En el contexto de la invención, se entiende por "tratamiento y/o prevención de la lengua azul" la administración de las nanoesferas y/o microesferas de la invención para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas de la infección, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la muerte. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para evitar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

En una realización particular del primer uso médico de la invención, el tratamiento se realiza en un sujeto.

El término "paciente" o "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, entre otros, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, no humanos primates, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o raza.

En una realización particular el primer uso médico de la invención comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanoesferas y/o microesferas. En otra realización particular del primer uso médico de la invención la nanoesfera y/o microesfera se administra en ausencia de un adyuvante. Sin querer estar vinculado a una teoría en particular, se considera que la administración de antígenos en ausencia de adyuvante favorece el desarrollo de una respuesta de tolerancia en el organismo, en lugar de una respuesta inflamatoria.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se entiende como una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico, y que puede ser determinada por la persona experta en la técnica por medios comúnmente utilizados. En particular, la cantidad terapéuticamente eficaz de las nanoesferas y/o microesferas de la

invención es aquella capaz de provocar una respuesta inmune en el sujeto. La cantidad de nanoesferas y/o microesferas de la invención que puede incluirse en las composiciones farmacéuticas según la invención variará dependiendo del sujeto y el modo particular de administración. Los expertos en la materia apreciarán que las dosificaciones también pueden determinarse con orientación de *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Goldman, novena edición (1996), apéndice II, páginas 1707-1711 y de *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Goldman, Décima Edición (2001), Apéndice II, pp. 475-493.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con las nanoesferas y/o microesferas de la invención o composición inmunogénica de la invención para su uso en tratamiento y/o prevención de la peste equina africana, de ahora en adelante el segundo uso médico de la invención, en donde las proteínas de fusión que comprende la nanoesfera se caracterizan por comprender al menos uno de:

- la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de peste equina africana (AHSV);
- una proteína con una secuencia funcionalmente equivalente a cualquiera de las anteriores.

El término “virus de peste equina africana” o “AHSV” (del inglés *African Horse Sickness*), tal y como se usa en la presente descripción, designa el Orbivirus AHSV, de la Familia Reoviridae, con virión icosaédrico desnudo de 60-80 nm., muy similar a los agentes de la Lengua Azul ovina o la Enfermedad Hemorrágica Epizootica de los ciervos. El AHSV es resistente a disolventes orgánicos, sales biliares, pero es sensible a los pHs no neutros, al calor y la putrefacción. Posee 9 tipos serológicos con antígenos fijadores de complemento comunes, pero con protección cruzada sólo entre el 6 y el 9. Virulencia variable, máxima en el serotipo 4, con mortalidad mayor del 90%, y mínima en el serotipo 9, en que oscila entre el 70 y el 80%. EL AHSV es causador de una enfermedad vírica aguda del equino, transmitida por artrópodos, de elevada mortalidad, presentación estacional y curso febril agudo, con cuadros cardíacos y pulmonares, y lesiones edematosas y hemorrágicas.

En una realización particular del segundo uso médico de la invención, la proteína no estructural 1 del AHSV comprende la secuencia identificada por el número de acceso P87505 en la base de datos de UniprotKB (Versión de la entrada 49, 14 de diciembre de 2022; versión de la secuencia 1, 1 de mayo de 1997).

El agente causal es el Orbivirus AHSV, de la Familia Reoviridae, con virión icosaédrico desnudo de 60-80 nm., muy similar a los agentes de la Lengua Azul ovina o la Enfermedad Hemorrágica Epizootica de los ciervos. Resiste disolventes orgánicos, sales biliares, pero es sensible a los pHs no neutros, al calor y la putrefacción. Es cultivable en células HeLa y BHK 21, y se puede aislar en huevo embrionado y ratón lactante. Posee 9 tipos serológicos con antígenos fijadores de complemento comunes, pero con protección cruzada sólo entre el 6 y el 9. Virulencia variable, máxima en el serotipo 4, con mortalidad mayor del 90%, y mínima en el serotipo 9, en que oscila entre el 70 y el 80%.

En el caso del segundo uso médico de la invención, la expresión "secuencia funcionalmente equivalente" se refiere a que las variantes de la proteína NS1 de AHSV mantienen totalmente o parcialmente su capacidad de funcionar como polipéptidos inmunogénicos, término descrito anteriormente.

Las variantes funcionalmente equivalentes de la proteína NS1 incluyen aquellas que muestran al menos un al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de las que derivan.

En una realización particular del segundo uso médico de la invención, el tratamiento se realiza en un sujeto., preferiblemente, preferiblemente un mamífero e incluye, entre otros, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, no humanos primates, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y ratones.

En una realización particular el segundo uso médico de la invención comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanoesferas y/o microesferas. En otra realización particular del tratamiento de la peste equina africana de la invención la nanoesfera se administra en ausencia de un adyuvante.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a nanoesferas y/o microesferas de la invención o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de diabetes tipo 1, de ahora en adelante el tercer uso médico de la invención, en donde la proteína de fusión que comprende la nanoesfera y/o microesfera se caracteriza por comprender la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP) según la secuencia con el número de

acceso Q9NQR9 de la base de datos UniProt, entrada del 3 de agosto de 2022, versión 1 de la secuencia.

El término “diabetes tipo 1” o “diabetes mellitus tipo I” o “diabetes juvenil” o “diabetes mellitus insulino-dependiente”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una enfermedad metabólica caracterizada por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas causando una deficiencia absoluta de insulina. Se diferencia de la diabetes tipo 2 porque es un tipo de diabetes caracterizada por darse en época temprana de la vida, generalmente antes de los 30 años. Sólo 1 de cada 20 personas diabéticas tiene diabetes tipo 1, la cual se presenta más frecuentemente en jóvenes y niños. La diabetes tipo 1 se clasifica en casos autoinmunes—la forma más común—y en casos idiopáticos. El término “diabetes tipo 1”, tal y como aquí se utiliza, incluye tanto diabetes tipo 1 clásica, que se diagnostica generalmente antes de los 30 años y precisa tratamiento con insulina desde que se hace el diagnóstico, como diabetes autoinmune latente del adulto, que se diagnostica a partir de los 30 años y no suele requerir tratamiento con insulina en los 3-6 meses tras el diagnóstico.

En una realización particular del tercer uso médico de la invención, la diabetes tipo 1 es diabetes tipo 1 autoinmune. El término “diabetes tipo 1 autoinmune”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a enfermedad autoinmune en la que existe una destrucción selectiva de las células β del páncreas mediada por linfocitos T activados en sujetos con haplotipos HLA de predisposición. Después de un período preclínico de duración variable, durante el cual el paciente permanece asintomático, cuando la masa de células productoras de insulina llega a un valor crítico el paciente presenta la sintomatología clásica: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y una progresiva cetosis que puede acabar en cetoacidosis, si no se instaura tratamiento con insulina exógena.

En una realización más particular del tercer uso médico de la invención, la diabetes tipo 1 es “diabetes autoinmune latente del adulto” o “LADA” (del inglés, “latent autoimmune diabetes of the adult”), tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un tipo de diabetes autoinmune que se diagnostica en la edad adulta, normalmente a partir de los 30 años, en sujetos que son positivos para al menos un autoanticuerpo de los que están normalmente presentes en pacientes con diabetes tipo 1 clásica, por ejemplo, anticuerpos anti islotes pancreáticos (ICA, del inglés “islet cell antibodies”), anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico (GADA, del inglés “glutamic acid decarboxylase antibodies”), anticuerpos asociados a isulinoma (IA-A2, del inglés “islet antigen-2 antibodies”) o anticuerpos anti-insulina (IAA, del inglés “insulin autoantibodies”), y que no requieren tratamiento con insulina en los primeros 3

o 6 meses tras el diagnóstico. La diabetes autoinmune del adulto se diferencia de la diabetes tipo 1 por el fallo lentamente progresivo de las células β y la consecuente dependencia gradual de insulina. En pacientes con LADA la función de las células β normalmente se ve afectada dentro de los seis años posteriores al diagnóstico.

5

En una realización preferida del tercer uso médico de la invención, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o raza. En una realización particular, el sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes tipo 1. Un sujeto que presenta riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 es aquel individuo con un familiar directo (hermano/a) con diabetes tipo 1 diagnosticada y que, además, presenta
10 múltiples (≥ 2) autoanticuerpos en suero dirigidos contra islotes pancreáticos (ICA), anti-decarboxilasa del ácido glutámico 65 (GADA65), antígeno de islotes 2 (IA-2) o el transportador de ZnT8 (ZnT8).

15

En una realización particular del tercer uso médico de la invención comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanoesferas y/o microesferas. En otra realización particular del tratamiento de diabetes tipo 1 de la invención la nanoesfera y/o microesfera se administra en ausencia de un adyuvante.

20

En otra realización particular del tercer uso médico de la invención, la administración de la nanoesfera y/o microesfera es por vía subcutánea o intravenosa.

25

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para inducir diabetes tipo 1 en un modelo animal, de ahora en adelante el método V de la invención, que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la nanoesfera y/o microesfera de la invención, en donde la proteína de fusión que comprende la nanoesfera y/o microesfera se caracteriza por comprender la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP).

30

En una realización particular, la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP) tiene la secuencia con el número de acceso Q9NQR9 de la base de datos UniProt, entrada del 3 de agosto de 2022, versión 1 de la secuencia.

35

La proteína IGRP es capaz de inducir diabetes cuando se administra a un ratón en forma de vacuna de ADN (Fuchs et al., Clinical and Experimental Immunology, 2014, 176: 199-206). En una realización particular, las variantes funcionalmente equivalentes de la proteína IGRP conservan la capacidad de inducir diabetes de la proteína IGRP de la que derivan. La capacidad de una proteína de inducir diabetes en un modelo animal se puede determinar por

métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, mediante la determinación de los niveles de glucosa en orina o en sangre. Por ejemplo, Fuchs et al. (supra) consideraron que existe diabetes en el modelo murino cuando se obtienen dos medidas consecutivas de niveles de glucosa en orina de más de 5,5 mmol/L o en sangre de más de 13,9 mmol/L.

5 Además, la proteína IGRP tiene actividad glucosa 6-fosfatasa, es decir, es capaz de catalizar la defosforilación de glucosa-6-fosfato a glucosa. En una realización particular del método V de la invención, las variantes funcionalmente equivalentes de la proteína IGRP conservan la actividad fosfatasa de la proteína IGRP de la que derivan. La actividad glucosa-6-fosfatasa se puede determinar por métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, métodos
10 basados en la detección de fosfato inorgánico en soluciones acuosas, como el método del verde de malaquita (Petrolonis et al., supra), o métodos basados en la detección de glucosa-6-fosfato, como por ejemplo los métodos basados en el sistema glucosa oxidasa/peroxidasa (Mao, H., et al., Anal. Chem. 2002, 74, 379–385).

15 En una realización particular del método V de la invención, el método comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la nanoesfera y/o microesfera de la invención.

El término “cantidad eficaz” se refiere a que la cantidad de nanoesferas y/o microesferas conlleva a que se considere que el sujeto al cual se administra la nanoesfera y/o microesfera
20 tiene diabetes.

En otra realización particular del método V de la invención la administración se hace vía subcutánea o intramuscular.

25 En otra realización particular del método V de la invención la nanoesfera y/o microesfera se administra junto con un adyuvante.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

30

EJEMPLOS

Materiales y Métodos y Resultados

35 *muNS-HA o HA-muNS no forma inclusiones citoplasmáticas*

Para purificar la proteína muNS-Mi se creó una proteína marcada con el epítipo hemaglutinina (HA) fusionada en el extremo carboxilo terminal de la proteína. El análisis de su expresión en células HeLa mediante inmunofluorescencia demostró que la adición de la etiqueta en el extremo C-terminal de la proteína muNS-Mi llevó a la pérdida de la capacidad de muNS-Mi de formar inclusiones citoplasmáticas (Figura 4).

Construcción de los plásmidos pET Duet 1- MiST y pET Duet 1- MiST/IC-avPAL.

La secuencia de muNS-Mi se obtuvo por amplificación por PCR a partir del plásmido pCIneo-muNS (488-635) (Brandariz-Núñez et al. A 2010, PLoS ONE 5(11) e13785) usando como cebador positivo 5'- CATGCCATGGCACCAGCCGTACTGCTGTC-3' (subrayada la diana NcoI y doblemente subrayado el ATG iniciador) (SEQ ID NO: 27) y como cebador negativo se usó 5'- TTGCGGCCGCAATCAGCCGGTTTCCGGCAGCAGATCATCCACC -3' (subrayada la diana NotI y doblemente subrayado el codon stop) (SEQ ID NO: 28) que contiene la secuencia del motivo de la sortasa seguido de un codon stop. El producto amplificado se insertó en el primer polylinker del plásmido pET Duet1 para generar el plásmido pET Duet1-MiST. La corrección de su secuencia y la presencia del motivo de la sortasa se confirmaron mediante secuenciación Sanger. La secuencia de la fenilalanina amonio liasa de *Anabaena vaiabilis* (AvPAL) marcada con IC en su N-terminal se obtuvo por digestión con enzimas de restricción del plásmido pET Duet1-muNS-Mi/2-IC-avPAL obtenido previamente en nuestro laboratorio (resultados propios no publicados) y se insertó en el segundo polylinker del plásmido pET Duet1-MiST para obtener el plásmido pET Duet1-MiST/2-IC-avPAL. La corrección de la secuencia fue confirmada por secuenciación Sanger.

Expresión y purificación de MiST.

Las bacterias competentes BL21 (DE3) se transformaron con el plásmido pET Duet1-MiST y la expresión de la proteína se indujo mediante incubación a 37°C durante 3 horas en presencia de 1mM de IPTG. Cuando se analizaron los extractos bacterianos totales por SDS-PAGE, se observó la presencia de una fuerte banda proteica con el PM aparente de MiST en el gel teñido (Figura 1 carril 2) que no estaba presente en los extractos de las bacterias no inducidas (Figura 1, carril 1). A continuación, se siguió el protocolo publicado para la purificación de las NS (Barreiro-Piñeiro, N. et al. 2018, Scientific Reports 8, 16286) dando como resultado el material purificado que se muestra en el carril 3 de la Figura 1, lo que indica la correcta formación de las NS. Además, las NS se observaron al microscopio óptico y también se caracterizaron por DLS como partículas con un diámetro medio de unos 460 nm. Para confirmar aún más la correcta formación de las NS, las bacterias no inducidas e inducidas por IPTG fueron precipitadas, fijadas y analizadas por TEM. La imagen de la Figura 1b muestra

la presencia de las típicas NS derivadas de muNS dentro de las bacterias inducidas, que no estaban presentes en las no transformadas (no se muestra).

Derivatización superficial de MiST mediada por sortasa

5 El siguiente paso fue probar si las NS formadas por MiST son capaces de reaccionar con un compuesto que contenga poliG catalizado por la sortasa. Para ello, se utilizó Sortasa 5Δ (SiMPLe Protein Labeling Kit, BPS Bioscience) y el sustrato fluorescente AZDye 488-Gly-Gly-Gly (Click Chemistry Tools, fórmula en la Figura 2a). Así, se incubaron las NS de muNS-Mi o las NS MiST purificadas a temperatura ambiente durante toda la noche con el sustrato en presencia de sortasa A. Tras la incubación, ambas muestras se dializaron para eliminar el exceso de sustrato y luego se observaron al microscopio de fluorescencia. La fluorescencia mostrada por la NS que contenía el motivo sortasa, era evidente al observarlas en el microscopio de fluorescencia (Figura 2a, imagen MiST-IC), mientras que no se observó fluorescencia en las NS muNS-Mi bajo las mismas condiciones (Figura 3a. Imagen muNS-Mi), indicando el éxito de la reacción.

Para eliminar la posibilidad de que una asociación inespecífica no covalente fuera la causa del etiquetado fluorescente observado, se sometieron ambas preparaciones de NS a SDS-PAGE y el gel sin teñir ni fijar se observó bajo luz UV, mostrando una banda fluorescente fuerte y clara correspondiente al peso molecular de MiST (Figura 2b, carril 4), mientras que no apareció ningún etiquetado fluorescente ni en el carril correspondiente a muNS-Mi (Figura 2b, carril 3), ni en ningún caso cuando la sortasa y el sustrato fluorescente estaban ausentes (Figura 2b, carriles 1 y 2). La presencia, la cantidad y la identidad de ambas proteínas también se confirmó en paralelo mediante un análisis de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-muNS (Figura 2c). Estos resultados demuestran inequívocamente que la unión covalente entre el sustrato fluorescente y MiST catalizada por la sortasa A fue la causa del etiquetado de MiST. El análisis Western-blot también muestra la ligera diferencia de tamaño entre muNS-Mi y MiST, debido a la adición de la secuencia sortasa-objetivo (Figura 2c, comparar carriles 1 y 2 o 3 y 4).

30 A continuación, se analizaron los efectos que la derivatización superficial de las MiST-NS con el AZDye tenía sobre su tamaño y carga. El análisis DLS mostró que la modificación mediada por la sortasa produjo un aumento aparente del tamaño de las NS de unos 19 nm. También se observó un aumento de la carga negativa medida por el potencial Z. Ambos resultados se ajustan perfectamente a las características de la molécula añadida (ver fórmula en la figura 2).

Tabla 1 - Análisis y comparación por DLS de MiST-IC no etiquetado o etiquetado AZDye 488-Gly-Gly-Gly

	Size (nm)	Pdl	Z Potencial (mv)
MiST NS	459 ± 16	0,44 ± 0,10	-27 ± 2
MiST NS+ <u>AZDye 488-Gly-Gly-Gly</u>	508 ± 21	0,50 ± 0,10	-34 ± 2

Co-purificación de una proteína externa con MiST en NS

- 5 Habiendo demostrado que MiST es capaz de formar NS correctamente y que esas NS también reaccionan con sustratos PolyG a través del motivo de sortasa C-terminal añadido, el siguiente paso fue comprobar si esta nueva construcción también era capaz de capturar proteínas marcadas con IC como la muNS-Mi nativa. Así, como se ha mencionado en el punto 1, se construyó el plásmido pET Duet1-MiST/IC-avPAL. Éste impulsa la expresión simultánea de
- 10 MiST (a partir del polilinker 1) y de IC-avPAL a partir del polilinker 2. Después de la inducción con IPTG en bacterias BL21 (DE3), las bandas correspondientes a los pesos moleculares de avPAL y MiST eran aparentes en el gel teñido (Figura 3, comparar carriles 1 y 2). Tras seguir el protocolo de los inventores publicado para la purificación de NS (Barreiro-Piñeiro, N. et al. 2018, Scientific Reports 8, 16286), ambas proteínas estaban aparentemente presentes en el
- 15 NS, por lo que permanecieron asociadas (Figura 3, carril 3). Cuando se comparó con las NS purificadas en paralelo con la muNS-Mi no modificada, ambas preparaciones de NS fueron extremadamente similares (Figura 3, comparar carriles 4 y 5), lo que indica que el comportamiento de la nueva construcción fue idéntico al de la muNS-Mi no sólo en la formación de inclusiones, sino también en la asociación con las proteínas marcadas con IC y
- 20 funcionará para todas las aplicaciones descritas de la metodología de IC-Tagging previamente caracterizada. De nuevo, la presencia de la secuencia diana de la sortasa en MiST (Figura 3, carril 5) reduce su migración en el gel de acrilamida en comparación con muNS-Mi sin modificar (Figura 3, carril 4). Cuando las NS formadas por MiST y que contienen avPAL se observaron bajo el TEM, se observaron estructuras de NS idénticas a las mostradas en la
- 25 Figura 1b, como se esperaba (no se muestra).

Conclusiones

- A pesar de las dificultades previstas, se ha desarrollado una nueva versión modificada de muNS-Mi, que se denominó MiST, que lleva una secuencia diana de sortasa A en su C-terminal.
- 5 - MiST sigue siendo capaz de formar NS que capturan proteínas marcadas con IC, imitando así a muNS-Mi en el sistema IC-Tagging.
- Además, las NS formadas por MiST pueden modificarse aún más con compuestos que poseen una fracción de poliglicina N-terminal (al menos 3xGly) por incubación con sortasa A.
- 10 - Esta nueva versión de muNS aumenta enormemente la versatilidad de la metodología de etiquetado IC previamente caracterizada, ya que prácticamente cualquier compuesto puede añadirse a la superficie de las esferas ya formadas.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende los siguientes componentes:
 - (i) un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - 5 - la secuencia 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del *Orthoreovirus aviar*,
 - la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero, y
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores con
 - 10 capacidad de formar nanoesferas, y/o microesferas y
 - (ii) un polipéptido que comprende el motivo de reconocimiento de una sortasa o la parte residual de un motivo de reconocimiento de sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa,
 - 15 en donde el componente (ii) está fusionado al extremo carboxilo del componente (i).
2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el motivo de reconocimiento de la sortasa es la secuencia de aminoácidos LPXTG (SEQ ID NO: 22), en donde X es cualquier aminoácido.
- 20 3. Proteína de fusión según la reivindicación 2, en donde el motivo de reconocimiento de la sortasa es la secuencia de aminoácidos LPETG (SEQ ID NO: 23).
4. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína de fusión comprende además un componente (iii) fusionado al extremo amino del
- 25 componente (i), donde el componente (iii) es un primer polipéptido de interés.
5. Proteína de fusión según la reivindicación 4, en donde el componente (iii) esta fusionado al componente (i) por una secuencia de reconocimiento por proteasas.
- 30 6. Proteína de fusión según la reivindicación 5, en donde la secuencia de reconocimiento por proteasas es una secuencia de reconocimiento por enteroquinasa o una secuencia de reconocimiento por factor Xa.
7. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el
- 35 componente (iii) comprende un péptido señal de la vía secretora.

8. Proteína de fusión según la reivindicación 7, en donde el péptido señal comprende la secuencia SEQ ID NO: 10.
- 5 9. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el componente (iii) comprende un péptido para facilitar su purificación.
- 10 10. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la proteína de fusión comprende además un componente de interés unido covalentemente a la parte residual del motivo de reconocimiento de sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa.
- 15 11. Proteína de fusión según la reivindicación 10 en donde el componente de interés se selecciona de un grupo que consiste en: ligandos de receptor de tipo Toll (TLR de "Toll-Like Receptors"), monofosforil lípido A (MPL A), oligonucleótidos seleccionados de islas CpG y ácido polinosínico:poliidílico (poly(I:C) – número CAS: 24939-03-5), saponina, moléculas lipídicas, moléculas de recubrimiento, oligosacáridos, anticuerpos, nanoanticuerpos, afitinias, antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental, un antígeno tumoral, en donde el componente de interés se caracteriza por comprender una secuencia oligoglicínica de al menos 3 glicinas.
- 20 12. Una nanoesfera o una microesfera que comprende una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 25 13. Nanoesfera o microesfera según la reivindicación 12, que además comprende una segunda proteína de fusión que comprende los siguientes componentes:
 - (a) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus aviar*,
 - un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la
 - 30 proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas, y
 - (b) un segundo polipéptido de interés.
- 35 14. Nanoesfera según la reivindicación 12 o 13, en donde la nanoesfera tiene un tamaño de entre 300 nm y 550 nm.

15. Microesfera según la reivindicación 12 o 13, en donde la microesfera tiene un tamaño de entre 1 μm y 4 μm .

16. Nanoesfera o microesfera según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la proteína de fusión comprende además un componente de interés unido covalentemente a la parte residual del motivo de reconocimiento de una sortasa generada después de una reacción mediada por sortasa.

17. Nanoesfera o microesfera según la reivindicación 16, en donde el componente de interés se selecciona de del grupo que consiste en:

- Ligandos de receptor de tipo Toll (TLR de "Toll-Like Receptors");
- Monofosforil lípido A (MPL A);
- oligonucleótidos seleccionados de islas CpG y ácido polinosínico:policidílico (poly(I:C) – número CAS: 24939-03-5);
- saponina;
- moléculas lipídicas;
- moléculas de recubrimiento seleccionadas de un grupo que consiste en: poligliceroles, polietilenglicol, quitosanos, poli(oxazolininas) (POX), poli(hidroxipropil metacrilato) (PHPMA), poli(2-hidroxietil metacrilato) (HEMA), poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (HPMA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(N,N-dimetil acrilamida) (PDMA) y poli(N-acriloilmorfolina) (PACM);
- oligosacáridos;
- anticuerpos;
- nanoanticuerpos;
- afitinas;
- antígeno viral;
- antígeno bacteriano;
- antígeno fúngico;
- alérgeno;
- antígeno medioambiental; y
- un antígeno tumoral.

18. Nanoesfera o microesfera según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en donde el primer polipéptido de interés, y/o el segundo polipéptido de interés, y/o el componente de interés es la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP).
- 5 19. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
20. Un casete de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 19.
- 10 21. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 19 o un casete de expresión según la reivindicación 20.
22. Vector según la reivindicación 21, que además comprende un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus aviar*,
- un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
- una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que
- 20 mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas.
23. Composición de vectores que comprende el vector según la reivindicación 22 y un segundo vector que comprende un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus aviar*,
- un polipéptido que comprende la secuencia 561-622 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* de mamífero,
- una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que
- 30 mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas.
24. Vector según la reivindicación 21 o 22 o composición de vectores según la reivindicación 23, en donde el polinucleótido según la reivindicación 19 o la casete de expresión según la reivindicación 20 está unido operativamente a un primer promotor y el segundo
- 35 polinucleótido está unido operativamente a un segundo promotor.

25. Vector o composición de vectores según la reivindicación 24, en donde el primer y el segundo promotor son el mismo promotor o son distintos promotores.
26. Vector o composición de vectores según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en donde dicho(s) vector(es) es un(son) vector(es) de expresión en bacterias.
27. Una célula que comprende una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, un polinucleótido según la reivindicación 19, un casete de expresión según la reivindicación 20, vector o composición de vectores según cualquier de las reivindicaciones 21 a 26.
28. Método para producir una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:
- (a) expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión,
 - (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas o microesferas, y
 - (c) concentrar las nanoesferas o microesferas.
29. Método según la reivindicación 28, que además comprende purificar la proteína de fusión separándola de las nanoesferas o microesferas.
30. Método según la reivindicación 28 o 29 en donde la célula es una célula bacteriana o una célula eucariota, en donde si es una célula bacteriana se forman nanoesferas en el paso (b) y si es una célula eucariota se forman microesferas en el paso (b).
31. Método para producir una proteína que comprende:
- (a) expresar en una célula un primer polinucleótido que codifica una proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 11 y un segundo polinucleótido que codifica una segunda proteína de fusión que comprende:
 - (i) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 25) de la proteína muNS del *Orthoreovirus* aviar,
 - un polipéptido que comprende la secuencia 518-721 (SEQ ID NO: 26) de la proteína muNS *Orthoreovirus* de mamífero,
 - una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que mantiene la capacidad de incorporarse a nanoesferas, y

- (ii) un segundo polipéptido de interés,
en donde el componente (ii) es la proteína producida;
 - (b) someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas o microesferas, y
 - 5 (c) concentrar las nanoesferas o microesferas.

- 32. Método según la reivindicación 28, que además comprende purificar la proteína de fusión separándola de las nanoesferas o microesferas.

- 10 33. Método según la reivindicación 31 o 22 en donde la célula es una célula bacteriana o una célula eucariota, en donde si es una célula bacteriana se forman nanoesferas en el paso (b) y si es una célula eucariota se forman microesferas en el paso (b).

- 15 34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 o 33, en donde la proteína es la proteína IGRP.

- 35. Un método para producir un primer polipéptido de interés, en donde el método comprende las siguientes etapas:
 - 20 (a) producir la proteína de fusión por el método según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en donde la proteína de fusión comprende:
 - un componente (iii) fusionado al extremo amino del componente (i), en donde el componente (iii) es el polipéptido de interés y
 - una secuencia de reconocimiento por una proteasa entre sus componentes (i) y (iii),
 - 25 (b) someter a las nanoesferas y/o microesferas a condiciones que conducen a su desintegración, produciéndose la separación de la proteína de fusión y las nanoesferas y/o microesferas,
 - (c) poner en contacto el producto resultante de la etapa (b) con una proteasa específica para la secuencia de reconocimiento que conecta los componentes
 - 30 (i) y (iii) de la proteína de fusión bajo condiciones adecuadas para la proteólisis de dicha proteína de fusión, con la consiguiente separación de los componentes (i) y (iii) de la proteína de fusión,
 - (d) someter el producto de la etapa (c) a condiciones adecuadas para la formación de las nanoesferas y/o microesferas y
 - 35 (e) separar las nanoesferas y/o microesferas del componente (iii).

36. Una proteína o polipéptido obtenible según el método de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 35.
37. Un método para producir una nanoesfera o microesfera según las reivindicaciones 14 a 18 que comprende las etapas de:
- (a) producir la proteína de fusión por el método según la reivindicación 28 o 30, y someter dicha célula a condiciones adecuadas para la formación de nanoesferas o microesferas.
38. Método según la reivindicación 37, que comprende además la etapa de incubar las nanoesferas y/o microesferas en presencia de una sortasa que reconoce el motivo de reconocimiento y un sustrato que comprende una etiqueta reconocida por la sortasa obteniéndose nanoesferas y/o microesferas que comprenden el sustrato que comprende la etiqueta reconocida por la sortasa.
39. Método según la reivindicación 37 o 38 en donde la célula es una célula bacteriana o una célula eucariota, en donde si es una célula bacteriana se forman nanoesferas en el paso (b) y si es una célula eucariota se forman microesferas en el paso (b).
40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en donde se purifican las nanoesferas o microesferas entre la etapa (b) y la etapa (c).
41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, en donde la sortasa es sortasa A, el motivo de reconocimiento es la secuencia SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23 y la etiqueta es una secuencia de poliglicina, preferiblemente la secuencia GGG.
42. Una composición farmacéutica o composición inmunogénica que comprende la nanoesfera y/o microesfera según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
43. Nanoesferas y/o microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 para su uso en medicina.
44. Nanoesferas y/o microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 o composición inmunogénica según la reivindicación 42 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la lengua azul, en donde las proteínas de fusión que comprende la nanoesfera se caracterizan por comprender al menos uno de:

- la proteína exterior de la cápside 2 (VP2) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- la proteína del núcleo 7 (VP7) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de la lengua azul 4 (BTV);
- una proteína con una secuencia funcionalmente equivalente a cualquiera de las anteriores.

5

45. Nanoesferas y/o microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 o composición inmunogénica según la reivindicación 42 para su uso en tratamiento y/o prevención de la peste equina africana en donde las proteínas de fusión que comprende la nanoesfera se caracterizan por comprender al menos uno de:

10

- la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de peste equina africana (AHSV);
- una proteína con una secuencia funcionalmente equivalente a cualquiera de las anteriores.

15

46. Nanoesferas y/o microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 o composición farmacéutica según la reivindicación 42 para su uso en el tratamiento y/o prevención de diabetes tipo 1, en donde la proteína de fusión que comprende la nanoesfera se caracteriza por comprender la proteína glucosa-6-fosfatasa 2 (IGRP) según la secuencia con el número de acceso Q9NQR9 de la base de datos UniProt, entrada del 3 de agosto de 2022, versión 1 de la secuencia.

20

47. Nanoesferas y/o microesferas para su uso según la reivindicación 46, en donde la diabetes tipo 1 es diabetes autoinmune latente del adulto.

25

48. Nanoesferas y/o microesferas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en donde la administración de la nanoesfera es por vía subcutánea o intravenosa.

49. Nanoesferas y/o microesferas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en donde la nanoesfera y/o microesfera se administra en ausencia de un adyuvante.

30

50. Un método para inducir diabetes tipo 1 en un modelo animal que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de la nanoesfera según la reivindicación 18.

51. El método según la reivindicación 50, en donde la administración se hace vía subcutánea o intramuscular.

35

52. El método según cualquiera de las reivindicaciones 50 o 51, en donde la nanoesfera se administra junto con un adyuvante.

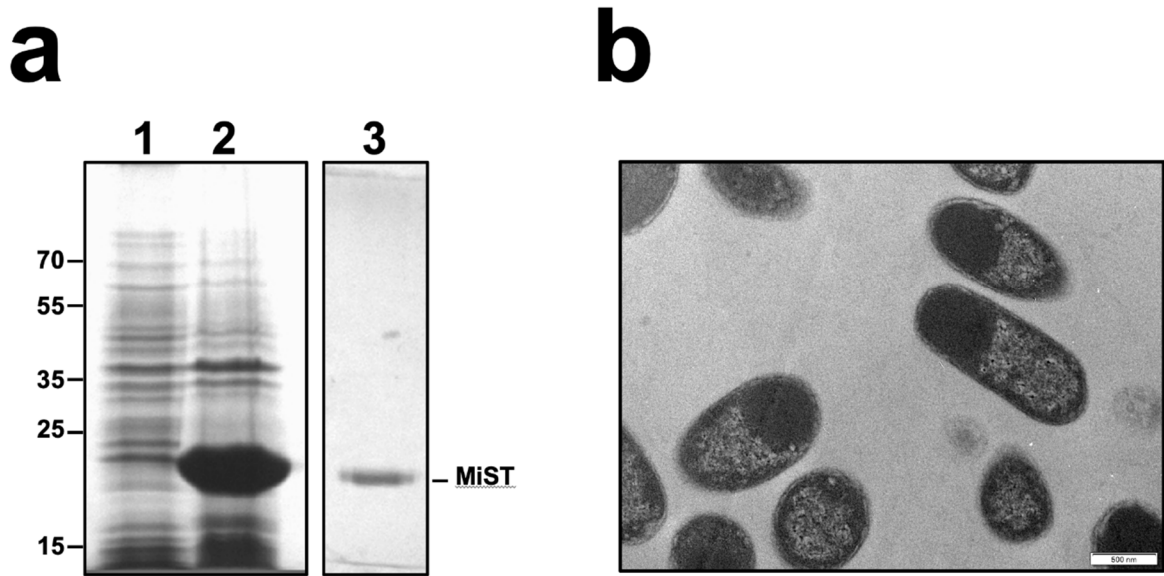


Figura 1

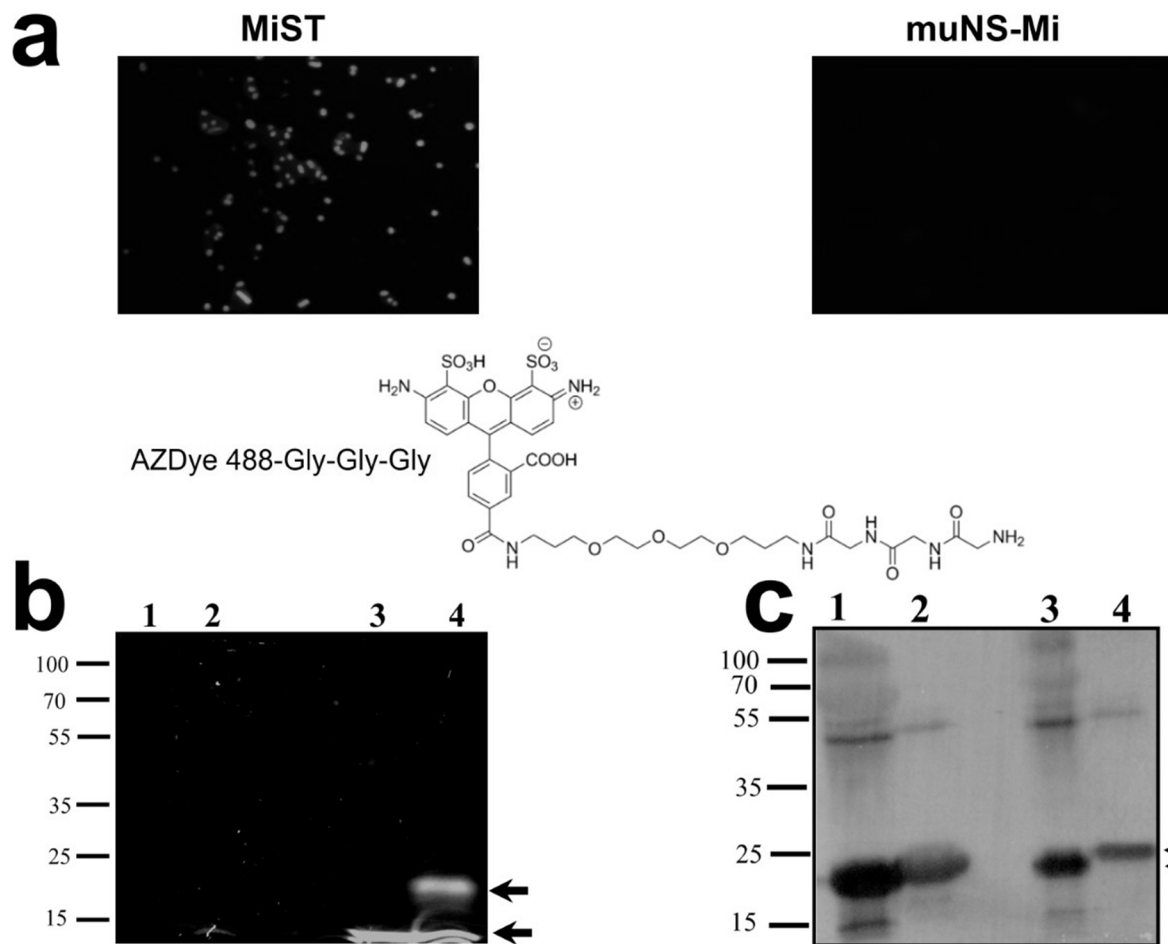


Figura 2

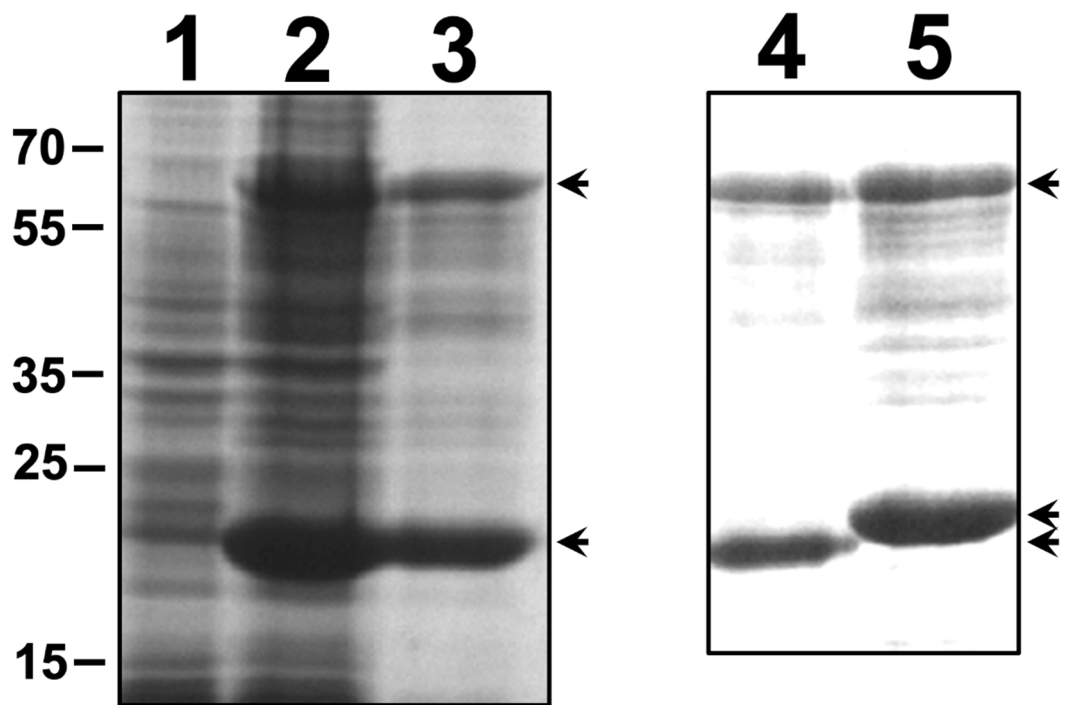


Figura 3

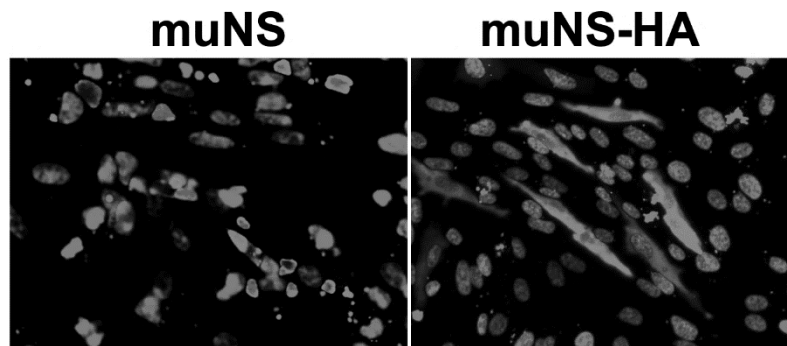


Figura 4