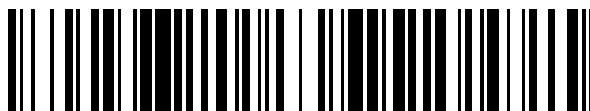


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 730**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10734875 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2453918**

54 Título: **Composiciones de proteína RSV F y procedimientos de fabricación de las mismas**

30 Prioridad:

15.07.2009 US 225805 P

12.01.2010 US 294426 P

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

16.03.2016

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)

Rue de l'Institut, 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

SWANSON, KURT y

DORMITZER, PHILIP R.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 563 730 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de proteína RSV F y procedimientos de fabricación de las mismas

Antecedentes de la invención

5 El virus respiratorio sincitial (RSV) es un virus de ARN de hebra negativa no segmentado de la familia *Paramyxoviridae*, género *Pneumovirus*. Es la causa más común de bronquiolitis y neumonía en niños durante su primer año de vida. El RSV también provoca infecciones repetidas, incluyendo enfermedad del tracto respiratorio inferior grave, que puede suceder a cualquier edad, especialmente en ancianos o en aquellos con los sistemas cardíaco, pulmonar o inmunitario comprometidos.

10 Para infectar a una célula hospedadora, los paramixovirus, tales como RSV, al igual que otros virus envueltos, tales como el virus de la gripe y el VIH, requieren de la fusión de la membrana viral con la membrana de una célula hospedadora. Para RSV, la proteína de fusión conservada (RSV F) fusiona las membranas viral y celular acoplado un replegamiento de la proteína irreversible con yuxtaposición de las membranas. En los modelos actuales basados en estudios en paramixovirus, la proteína RSV F se pliega inicialmente en una conformación metaestable de "pre-fusión". Durante la entrada en la célula, la conformación de pre-fusión sufre un replegamiento y cambios conformacionales a su conformación estable "post-fusión".

15 La proteína RSV F se traduce a partir del ARNm en una proteína de aproximadamente 574 aminoácidos designada F0. El procesamiento protraduccional de F0 incluye la retirada de un péptido de señal N-terminal mediante una peptidasa de señal en el retículo endoplasmático. F0 también se escinde en dos sitios (aproximadamente en 109/110 y aproximadamente 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi. Esta escisión da como resultado la retirada de una sección intermedia corta y genera dos subunidades, denominadas F1 (~50 kDa; C-terminal; aproximadamente los restos 137-574) y F2 (~20 kDa; N-terminal; aproximadamente los restos 1-109) que permanecen asociadas entre sí. F1 contiene un péptido de fusión hidrófobo en su extremo N-terminal y también dos regiones de repetición de héptada anfipática (HRA y HRB). HRA está próxima al péptido de fusión y HRB está próxima al dominio transmembrana. Se ensamblan tres heterodímeros F₁-F₂ en forma de homotrímeros de F₁-F₂ en el virión.

20 El documento WO2009079796 se refiere a la obtención de polipéptidos RSV F recombinantes que son fáciles de purificar en forma soluble trimérica, y desvela polipéptidos de RSV F en los que se eliminan ambos sitios de escisión de furina del polipéptido (es decir, FCS2 y FCS1), y en los que también se elimina una secuencia 23mer intermedia. Zimmer y col. (2002, *Journal of Virology*, 76(18) págs. 9218-9224), documento WO 2003/083095 y Valarcher y col. (2006, *Journal of General Virology*, 87(6) págs. 1659-1667) investigan los efectos de las mutaciones o eliminaciones de FCS2 y/o p27 en la replicación de RSV y en la patogenicidad de RSV, y discuten las posibles implicaciones de las mutaciones o eliminaciones de FCS2 y/o p27 en la producción de vacunas de RSV vivas atenuadas.

25 Actualmente no hay disponible una vacuna contra la infección por RSV, pero es deseable. Una estrategia potencial para producir una vacuna es una vacuna de subunidad basada en la proteína RSV F purificada. Sin embargo, para esta estrategia es deseable que la proteína RSV F purificada esté en una sola forma y conformación que sea estable a lo largo del tiempo, consistente entre lotes de vacuna, y convenientemente purificada.

30 La proteína RSV F puede truncarse, por ejemplo, mediante la eliminación del dominio transmembrana y la cola citoplasmática, para permitir su expresión en forma de un ectodominio, que puede ser soluble. Además, aunque la proteína RSV F se traduce inicialmente en forma de un monómero, los monómeros se escinden y se ensamblan en trímeros. Cuando la proteína RSV F está en forma de trímeros escindidos, se expone el péptido de fusión hidrófobo. Los péptidos de fusión hidrófobos expuestos en diferentes trímeros, por ejemplo, trímeros de ectodominio solubles, pueden asociarse entre sí, dando como resultado la formación de rosetas. Los péptidos de fusión hidrófobos también pueden asociarse con lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, a partir de células que se usan para expresar proteína RSV F soluble recombinante. Debido a la complejidad del procesamiento, estructura y replegamiento de la proteína RSV F, es difícil obtener preparaciones purificadas, homogéneas e inmunogénicas.

35 Por lo tanto, hay una necesidad de composiciones de proteína RSV F mejoradas y de procedimientos para preparar composiciones de proteína RSV F.

Sumario de la invención

40 La invención se refiere a un polipéptido F del virus respiratorio sincitial (RSV F) recombinante en el que los aminoácidos 100-150, numerados en relación a la SEC ID N°: 1, se reemplazan con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9.

La invención también se refiere a composiciones inmunogénicas que contienen uno o más polipéptidos de RSV F, y a determinadas proteínas RSV F modificadas por ingeniería genética y a ácidos nucleicos que codifican a las proteínas RSV F modificadas por ingeniería genética.

55 La invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende: (a) uno o más polipéptidos F del virus

respiratorio sincitial (RSV F) de acuerdo con la reivindicación 1; preferentemente en el que: (i) dicho polipéptido RSV F es un polipéptido soluble que comprende el ectodominio de RSV F; o (ii) dicho RSV F comprende los aminoácidos 23-99 y 151-524 de (SEC ID N°: 1) o (SEC ID N°: 2), o (b) un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en (SEC ID N°: 49), (SEC ID N°: 60) o (SEC ID N°: 71), y cualquiera de las secuencias anteriores en las que se omitan el péptido de señal y opcionalmente el marcador HIS, en las que el péptido de señal corresponde a los aminoácidos 1-121 de SEC ID N°: 1, y en el que el marcador His corresponde a SEC ID N°: 110.

En un aspecto, la proteína RSV F es soluble. Por ejemplo, la proteína RSV F puede tener eliminadas la región transmembrana y la cola citoplasmática. En algunos aspectos, la RSV F soluble contiene uno o más de 1) una o más mutaciones en uno o ambos sitios de escisión de furina, 2) una o más mutaciones en el péptido de fusión, 3) una o más mutaciones en el enlazador p27, 4) contiene una secuencia de oligomerización añadida, y 5) contiene una secuencia de aminoácidos añadida que proporciona un sitio de escisión de proteasas. En aspectos adicionales o alternativos, la proteína RSV F es un monómero, un trímero, o una combinación de monómeros y trímeros. El trímero puede estar monodisperso o en forma de una roseta. En otros aspectos adicionales o alternativos, la proteína RSV F puede encontrarse en una conformación de pre-fusión, en una conformación intermedia o en una conformación post-fusión.

La composición inmunogénica contiene un polipéptido de RSV F en el que se reemplazan los aminoácidos 100-150 con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

La divulgación también proporciona una composición inmunogénica que contiene uno o más polipéptidos F de virus respiratorio sincitial (RSV F) en los que los aminoácidos 100-150 se reemplazan con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7; SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 91 o SEC ID N°: 92. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En otro aspecto de la divulgación, la composición inmunogénica contiene un polipéptido de RSV F en el que RSV F contiene los aminoácidos 23-99 y 151-524 de SEC ID N°: 1 o de SEC ID N°: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En un aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 60 y SEC ID N°: 71. La divulgación también proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 68, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 33, SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 41, SEC ID N°: 42, SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 46, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 48, SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 64, SEC ID N°: 65, SEC ID N°: 66, SEC ID N°: 67, SEC ID N°: 69, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 85, SEC ID N°: 86, SEC ID N°: 87, SEC ID N°: 88, SEC ID N°: 89, y SEC ID N°: 93. En algunas realizaciones, se omite el péptido de señal y/o el marcador His. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

La composición inmunogénica puede contener un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 71, y cualquiera de las secuencias anteriores en las que se omitan el péptido de señal y opcionalmente el marcador HIS. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En realizaciones preferidas, la composición inmunogénica incluirá un adyuvante. El adyuvante es preferentemente una sal de aluminio, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59), un compuesto de benzonafiridina, un compuesto fosfolipídico (tal como E6020), un inmunopotenciador de molécula pequeña o una combinación de cualesquiera dos o más de cualquiera de los anteriores.

Otro aspecto más de la invención incluye polipéptidos RSV F recombinantes. El RSV F puede estar en forma de monómero, trímero, roseta de trímeros, o una combinación de monómeros y trímeros. El polipéptido recombinante puede incluir un dominio de oligomerización heterólogo, un epítipo o un péptido de señal. El dominio de oligomerización heterólogo es preferentemente un dominio de trimerización de hemaglutinina de la gripe, de spike de SARS, o de gp41, NadA, GCN4 modificada o ATCasa de VIH.

El polipéptido RSV F recombinante de la invención tiene los aminoácidos 100-150 numerados en relación a SEC ID N°: 1 reemplazados con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9. La divulgación también proporciona polipéptido de RSV F recombinante con los aminoácidos 100-150 numerados en relación a SEC ID N°: 1 reemplazados con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 91 o SEC ID N°: 92. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En un aspecto, el polipéptido recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 60 y SEC ID N°: 71. La divulgación también proporciona polipéptido recombinante seleccionado entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 68, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 31, SEC ID N°:

33, SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 41, SEC ID N°: 42, SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 46, SEC ID N°: 48, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 64, SEC ID N°: 65, SEC ID N°: 66, SEC ID N°: 67, SEC ID N°: 69, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 85, SEC ID N°: 86, SEC ID N°: 87, SEC ID N°: 88, SEC ID N°: 89, SEC ID N°: 93, y cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, se omite el péptido de señal y/o el marcador His. En algunas realizaciones, el polipéptido RSV F es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

Otro aspecto más incluye ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos anteriores. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARN autorreplicante.

Otro aspecto de la divulgación es una composición inmunogénica que comprende un ARN autorreplicante que codifica un polipéptido de RSV F. La composición inmunogénica puede incluir un sistema de administración.

Otro aspecto de la invención incluye procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria a RSV F mediante la administración de cualquiera de las composiciones inmunogénicas.

La divulgación se refiere a procedimientos para preparar composiciones y a composiciones que comprenden proteína RSV F, tal como polipéptidos de ectodominio de RSV F solubles, incluyendo composiciones inmunogénicas. Los polipéptidos de ectodominio de RSV F puede encontrarse en una sola forma, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, o rosetas de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ectodominio de RSV F también pueden estar en dos o más formas, por ejemplo, dos o más formas que existan en equilibrio, tal como equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la presencia de una sola forma deseada de RSV F en una composición inmunogénica proporciona una respuesta inmunitaria más predecible cuando la composición se administra a un sujeto, y una estabilidad más consistente y otras características físicas y químicas cuando se formulan en una vacuna.

En un aspecto, la divulgación es un procedimiento para producir una composición que comprende polipéptidos de ectodominio de RSV F escindidos. El procedimiento incluye a) proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindida que contienen uno o más sitios de escisión de proteasa que, cuando se escinde, producen fragmentos F₁ y F₂, y b) escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos con una proteasa o proteasas que reconocen al sitio o sitios de escisión de proteasas. En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de RSV F no escindidos contiene sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan de una célula hospedadora que los produce no escindidos en una posición desde el aminoácido 101 al aminoácido 161, (por ejemplo, no está escindido en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados en a) pueden purificarse. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados en a) pueden comprender un péptido de fusión intacto o un péptido de fusión alterado (por ejemplo, un péptido de fusión eliminado o péptido de fusión mutado). Cuando los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados en a) contienen un péptido de fusión intacto, la escisión en la etapa b) da como resultado la formación de rosetas o trímeros. Cuando los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados en a) comprenden un péptido de fusión alterado, la escisión en la etapa b) da como resultado la formación de trímeros.

El procedimiento puede comprender además la etapa opcional de purificar las rosetas o trímeros producidos mediante la escisión de los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos.

En realizaciones preferidas, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos producidos de acuerdo con el procedimiento están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir una composición que comprende monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. El procedimiento incluye a) proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos; y b) purificar los monómeros o trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos a partir del material biológico. En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de RSV F no escindidos contiene sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan de una célula hospedadora que los produce no escindidos en una posición desde el aminoácido 101 al aminoácido 161, (por ejemplo, no está escindido en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de RSV F no escindidos contiene además sitios de escisión de tripsina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no se escinden por tripsina en un sitio entre el aminoácido 101 y el aminoácido 161. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos contiene además un péptido de fusión alterado.

En algunas realizaciones, se purifican los trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. En otras realizaciones, se purifican los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. En otras realizaciones, se purifica una mezcla de monómeros y trímeros de ectodominio de proteína RSV F no escindida, que pueden encontrarse en un equilibrio dinámico. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos producidos de acuerdo con el procedimiento están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir una composición que comprende monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F escindidos. El procedimiento incluye a) proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos que contenga un péptido de fusión alterado; y b) purificar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos a partir del material biológico.

En algunas realizaciones, se purifican los trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos. En otras realizaciones, se purifican los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos. En otras realizaciones, se purifica una mezcla de monómeros y trímeros de ectodominio de proteína RSV F escindidos, que pueden encontrarse en un equilibrio dinámico. En realizaciones preferidas, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos producidos de acuerdo con el procedimiento están preferentemente sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas. En otra realización más, se purifica un trímero de ectodominio de proteína RSV F que contiene un péptido de fusión alterado.

En otros aspectos, la invención proporciona composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas, producidas usando los procedimientos de la divulgación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un esquema de RSV F de tipo silvestre (FIG 1A) y de una construcción de ectodominio en la que se han retirado el dominio transmembrana y la cola citoplasmática y se ha añadido un marcador HIS6 al extremo C-terminal (FIG 1B). Por claridad, la numeración de restos se refiere a la cepa A2 de RSV F de tipo silvestre, comenzando en el péptido de señal N-terminal y no está alterado en construcciones que contienen eliminaciones de aminoácidos. En el esquema se encuentra marcado la secuencia de señal o péptido de señal (sp). La FIG. 1A es un esquema de la proteína RSV F que muestra la secuencia de señal o péptido de señal (SP), la región enlazadora p27, el péptido de fusión (FP), el dominio HRA (HRA), el dominio HRB (HRB), la región transmembrana (TM), y la cola citoplasmática (CT). Los límites del extremo C-terminal pueden variar. La FIG 1B es un esquema general de la construcción de ectodominio de RSV F que ilustra las características compartidas con los esquemas en la FIG. 1A e incluye un marcador HIS₆ opcional (MARCADOR HIS). Los sitios de escisión de furina están presentes en las posiciones de aminoácidos 109/110 y 136/137. La FIG. 1C también muestra la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 100 - 150 de RSV F (tipo silvestre) (SEC ID N°: 108) y varias proteínas (Furmt, SEC ID N°: 3; Furdel, SEC ID N°: 4; Furx, SEC ID N°: 6; Furx R113Q, K123N, K124N, SEC ID N°: 5; Furx R113Q, K123Q, K124Q, SEC ID N°: 92; Delp21 furx, SEC ID N°: 7; Delp23 furx, SEC ID N°: 8; Delp23 furdel, SEC ID N°: 9; N-terminal de furina, SEC ID N°: 10; C-terminal de furina, SEC ID N°: 11; Eliminación 1 de péptido de fusión, SEC ID N°: 12; y Facto Xa, SEC ID N°: 13) en los que uno o ambos sitios de escisión de furina y/o la región del péptido de fusión se habían mutado o eliminado. En la FIG. 1C, el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado.

La FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo desde la posición de aminoácido 488 hasta el comienzo de la región TM de RSV F (tipo silvestre) (SEC ID N°: 94) y varias proteínas (SEC ID N°: 95-100) que contienen sitios de escisión de proteasas añadidos. En la FIG. 2, el símbolo "-" indica que no hay aminoácido en esa posición.

La FIG. 3 es un cromatograma y una imagen de un gel de electroforesis que muestra la purificación de monómeros de RSV F (3) usando cromatografía de exclusión por tamaño.

Las FIG. 4A-4F muestra la secuencia nucleotídica (SEC ID N°: 101) del plásmido que codifica la molécula de ARN autorreplicante pT7-TC83R-FL.RSVF (A317) que codifica la glucoproteína F del virus respiratorio sincitial (RSV F). La secuencia nucleotídica que codifica RSV F está subrayada.

La FIG. 5 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de varias cepas de RSV. El alineamiento se preparó usando el algoritmo desvelado por Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22): 10881-10890, usando parámetros por defecto (tabla de comparación de símbolos Blossum 62, penalización por hueco abierto: 12, penalización por extensión de hueco: A2, proteína F de la cepa A2 (número de referencia AF035006) (SEC ID N°: 102); CP52, proteína F de la cepa CP52 (número de referencia AF013255) (SEC ID N°: 103); B, proteína F de la cepa B (número de referencia AF013254) (SEC ID N°: 104); larga, proteína F de la cepa larga (número de referencia AY911262) (SEC ID N°: 105), y cepa 18537, proteína F de la cepa 18537 (número de referencia Swiss Prot P13843) (SEC ID N°: 106). También se muestra un consenso de las secuencias de proteína F (SEC ID N°: 107)

La FIG. 6 muestra regiones relevantes de cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) de purificaciones de antígeno de RSV F seleccionadas. El pico principal que contiene el antígeno indicado se indica mediante un asterisco con el tiempo de retención de la columna Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) indicado en mililitros. En una columna calibrada, los tiempos de retención aproximados de 47 ml, 65 ml y 77 ml corresponden al volumen vacío de la columna, la retención del trímero de RSV F y la retención del monómero de RSV F,

respectivamente. En la FIG. 6A, la construcción Delp23 Furdel (Ap23 Furdel) no escindida se purifica a partir del pico de monómero a aproximadamente 77 ml. Cuando se trata el antígeno Delp23 Furdel de RSV F no escindido con tripsina, la proteína puede formar rosetas, que ahora migran en la SEC en el volumen vacío a aproximadamente 47 ml (FIG. 6B). La especie de trímero escindido de la eliminación de péptido de fusión de RSV F se purifica a partir del pico de trímero a un tiempo de retención de aproximadamente 65 ml (FIG. 6C) mientras que la construcción Delp21 Furx no escindida (Ap21 Furx) se purifica a partir del pico de monómero a aproximadamente 77 ml (FIG. 6D).

La FIG. 7 muestra imágenes de EM representativa de antígenos RSV F seleccionados. La FIG. 7A muestra una imagen de EM de Ap23 de RSV F (Delp23) antes del tratamiento de tripsina. Las formas de muleta en la FIG. 7A, coherentes con una conformación de trímero post-fusión, no siempre se observan en la construcción Ap23 (Delp23) Furdel no escindida. Cuando la construcción Ap23 (Delp23) Furdel se trata con tripsina y se purifica a partir del volumen vacío de una columna de SEC y se observa mediante EM se detecta que las proteínas han adoptado conformaciones de roseta (FIG. 7B). Cuando la construcción de eliminación de péptido de fusión de RSV F se purifica a partir del pico de trímero en una columna de SEC, se observa una forma de muleta monodispersa, coherente con el trímero post-fusión (FIG. 7C). Se muestran en la FIG. 7D tres preparaciones de Ap21 (Delp21) furx RSV F (monómero marcado), RSV F de eliminación de péptido de fusión (carriles de trímero marcado) y rosetas de RSV F purificadas (rosetas marcadas). El gel contiene varios carriles de patrón de espectro completo de GE (los patrones de peso molecular están marcados a la izquierda del gel) mientras que los tiempos de retención aproximados de RSV F se indican a la derecha del gel.

Las FIG. 8A-8C son gráficas que muestran que los monómeros (Ap21 (Delp21) furx no escindidos), rosetas o trímeros (Ap23 (Delp23) Furdel escindidos), y trímeros (eliminación de péptido de fusión) de polipéptidos de ectodominio de RSV-F son inmunogénicos en ratas del algodón. Los títulos en suero de IgG anti-RSV F y de anticuerpos neutralizantes anti-RSV se midieron 2 semanas después de la 1ª vacunación (2sd1), 3 semanas después de la 1ª vacunación (3sd1) y/o 2 semanas después de la 2ª vacunación (2sd2).

25 **Descripción detallada de la invención**

La invención se refiere a polipéptidos y/o proteínas F del virus respiratorio sincitial (RSV F), a composiciones inmunogénicas que comprenden polipéptidos y/o proteínas de RSV F, y a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos y/o proteínas de RSV F. También se desvelan procedimientos para producir polipéptidos y/o proteínas de RSV F y composiciones que comprenden polipéptidos y/o proteínas de RSV F.

30 En general, las composiciones inmunogénicas comprenden polipéptidos y/o proteínas de RSV F que contienen mutaciones (por ejemplo, reemplazos, eliminaciones o adiciones de aminoácidos) que proporcionan características beneficiosas, tales como una o más de 1) conformación prefusión o intermedia (no post-fusión) estabilizada, 2) exposición reducida o eliminada del péptido de fusión, 3) estabilidad mejorada (por ejemplo, agregación y/o degradación reducidas, y 4) mayor semejanza a la proteína viral F1/F2 activa. Estas características proporcionan ventajas para las composiciones inmunogénicas y para la fabricación de las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, como se describen en este documento, las conformaciones no post-fusión de la proteína RSV F (es decir, la conformación pre-fusión, conformaciones intermedias) pueden ser mejores inmunógenos y provocar una mejor respuesta de anticuerpo neutralizante. La reducción o la eliminación de la exposición del péptido de fusión, por ejemplo, introduciendo mutaciones o eliminaciones en los sitios de escisión de furina, reducirán la hidrofobicidad del polipéptido y facilitará las purificaciones, y también reducirá o eliminará la asociación de la proteína RSV F con membranas celulares en un sujeto a quien se administre la proteína. La estabilidad mejorada de las proteínas facilita la producción de composiciones inmunogénicas en las que la proteína tiene una tendencia disminuida a agregarse o degradarse, lo que proporciona una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto. Finalmente, los polipéptidos o proteínas de RSV F mutantes que se asemejan a la proteína viral F1/F2, por ejemplo, mediante la eliminación de la totalidad o parte de la región enlazadora p27, puede suscitar una mejor respuesta neutralizante de anticuerpos. Otras ventajas de la invención se describen en el presente documento.

La divulgación también se refiere a procedimientos para preparar composiciones que contienen proteína RSV F, en particular polipéptidos de ectodominio de RSV F, y a composiciones que incluyen composiciones inmunogénicas que comprenden proteína RSV F. Preferentemente, los polipéptidos de ectodominio de RSV F se encuentran en una forma individual o en un equilibrio dinámico entre formas conocidas.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "población" se refiere a más de un polipéptido o proteína de RSV F que está presente en una composición. La población puede ser sustancialmente homogénea, en la que sustancialmente todos los polipéptidos o proteínas de RSV F son sustancialmente iguales (por ejemplo, misma secuencia de aminoácidos, misma configuración), heterogénea, o tiene un grado de homogeneidad deseado (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % de los polipéptidos o proteínas de RSV F tienen conformación pre-fusión, tienen conformación post-fusión, son monómeros, son trímeros).

La "conformación post-fusión" de la proteína RSV F es un trímero caracterizado por la presencia de un nudo de seis hélices que comprende 3 regiones HRB y 3 HRA.

La "conformación pre-fusión" de la proteína RSV F es una conformación caracterizada por un trímero que contiene una triple hélice que comprende 3 regiones HRB.

5 Tal como se usa en el presente documento, el "polipéptido de ectodominio de RSV F" se refiere a un polipéptido de la proteína RSV F que contiene sustancialmente la porción extracelular de la proteína RSV F madura, con o sin el péptido de señal (por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 524, o de aproximadamente el aminoácido 22 a aproximadamente el aminoácido 524) pero carece del dominio transmembrana y de la cola citoplasmática de la proteína RSV F de origen natural.

10 Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de RSV F escindido" se refiere a un polipéptido de ectodominio de RSV F que se ha escindido en una o más posiciones entre aproximadamente 101/102 a aproximadamente 160/161 para producir dos subunidades, en la que una de las subunidades comprende F₁ y la otra subunidad comprende F₂.

15 Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de RSV F C-terminal no escindido" se refiere a un polipéptido de ectodominio de RSV F que está escindido en una o más posiciones entre aproximadamente 101/102 a aproximadamente 131/132, y no está escindido en una o más posiciones entre aproximadamente 132/133 a aproximadamente 160/161, para producir dos subunidades, en el que una de las subunidades comprende F₁ y la otra subunidad comprende F₂.

20 Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de RSV F no escindido" se refiere a un polipéptido de ectodominio de RSV F que no está escindido en una o más posiciones entre aproximadamente 101/102 a aproximadamente 160/161. Un polipéptido de ectodominio de RSV F no escindido puede ser, por ejemplo, un monómero o un trímero.

Tal como se usa en el presente documento, "péptido de fusión" se refiere a los aminoácidos 137-154 de la proteína RSV F.

25 Tal como se usa en el presente documento, "péptido de fusión alterado" se refiere a un péptido de fusión en el que se reemplazan o eliminan independientemente uno o más aminoácidos, incluyendo el reemplazo o eliminación de todos los aminoácidos entre las posiciones 137-154. Preferentemente, los polipéptidos de ectodominio de RSV F escindidos que contienen un "péptido de fusión alterado" no forman rosetas.

30 Tal como se usa en el presente documento, una proteína o polipéptido "purificado" es una proteína o polipéptido que se produce de manera recombinante o sintética, o se produce por su hospedador natural, y se ha aislado de otros componentes del sistema de producción recombinante o sintético o del hospedador natural de tal forma que la cantidad de la proteína en relación a otros componentes macromoleculares presentes en una composición es sustancialmente mayor que la presente en una preparación en bruto. En general, una proteína purificada será homogénea en al menos aproximadamente el 50 % y más preferentemente en al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogénea.

35 Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente libre de lípidos y lipoproteínas" se refiere a composiciones, proteínas y polipéptidos que están al menos aproximadamente un 95 % libres de lípidos y lipoproteínas en proporción en masa cuando se observa la pureza de la proteína y/o polipéptido (por ejemplo, polipéptido de RSV F) en un gel de SDS PAGE y se mide el contenido total de proteína usando absorción UV280 o análisis BCA, y el contenido de lípido y lipoproteína se determina usando el ensayo de fosfolipasa C (Wako, n.º de código 433-36201).

40 Tal como se usa en el presente documento, un "sitio de escisión de furina alterado" se refiere a la secuencia de aminoácidos en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136 en la proteína RSV F de origen natural que se reconocen y escinden por furina o proteasas similares a furina, pero en un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido contiene uno o más reemplazos de aminoácidos, una o más eliminaciones de aminoácidos, o una combinación de uno o más reemplazos de aminoácidos y una o más eliminaciones de aminoácidos, de tal forma que un polipéptido de ectodominio de RSV F que contiene un sitio de escisión de furina alterado se secreta de una célula que la produce no escindida en el sitio de escisión de furina alterado.

45 Las características de los ectodominios de proteínas RSV F adecuadas para su uso en esta invención se describen en el presente documento con referencia a aminoácidos particulares que se identifican por la posición del aminoácido en la secuencia de la proteína RSV F de la cepa A2 (SEC ID N°: 1). Los ectodominios de la proteína RSV F pueden tener la secuencia de aminoácidos de la proteína F de la cepa A2 o de cualquier otra cepa deseada.

55 Cuando se usa el ectodominio de la proteína F de una cepa distinta de A2, los aminoácidos de la proteína F se numerarán con referencia a la numeración de la proteína F de la cepa A2, con la inserción de huecos según se necesite. Esto puede lograrse alineando la secuencia de cualquier proteína RSV F con la proteína F de la cepa A2,

tal como se muestra en el presente documento para proteínas F de la cepa A2, la cepa CP52, la cepa B, la cepa larga, y la cepa 18537. Véase la FIG 5. Los alineamientos de secuencia se producen preferentemente usando el algoritmo desvelado por Corpet, *Nucleic Acids Research*, 1998, 16(22): 10881-10890, usando parámetros por defecto (tabla de comparación de símbolos Blossum 62, penalización por hueco abierto: 12, penalización por extensión de hueco: 2).

La invención proporciona polipéptidos y proteínas RSV F solubles, y composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos y proteínas RSV F solubles, así como composiciones que comprenden ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ARN autorreplicantes) que codifican a los polipéptidos y proteínas RSV F solubles.

Los polipéptidos RSV F (por ejemplo, polipéptidos de ectodominio) pueden estar en cualquier forma deseada, tal como en forma individual, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, o rosetas de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ectodominio de RSV F también pueden estar en dos o más formas, por ejemplo, dos o más formas que existan en equilibrio, tal como equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la presencia de una sola forma deseada de RSV, o de un equilibrio dinámico entre formas conocidas, en una composición inmunogénica, proporciona una formulación, solubilidad y estabilidad más predecibles, y una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto.

Preferentemente, los polipéptidos de ectodominio de RSV F se encuentran en una sola forma, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos, o en un equilibrio dinámico entre un subconjunto de dichas formas (por ejemplo, equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros escindidos).

En un aspecto de la invención, los polipéptidos y proteínas RSV F se encuentran en conformación pre-fusión. Los epítomos de la conformación pre-fusión puede ser más capaces de provocar anticuerpos que puedan reconocer y neutralizar viriones naturales.

En una realización de la invención una composición inmunogénica comprende una población de glucoproteínas F de virus respiratorio sincitial en conformación pre-fusión. En otro aspecto de la invención, una composición inmunogénica comprende una población de glucoproteínas F de virus respiratorio sincitial que desfavorecen la conformación post-fusión en comparación con una población de glucoproteínas RSV F aisladas.

La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que muestra un epítomo presente en una conformación pre-fusión o de fusión intermedia de la glucoproteína F del virus respiratorio sincitial pero carente de la conformación post-fusión de la glucoproteína.

La glucoproteína F

La glucoproteína F de RSV dirige la penetración vírica mediante fusión entre la envuelta del virión y la membrana plasmática de la célula hospedadora. Es una proteína integral de membrana de un solo paso de tipo I que tiene cuatro dominios generales: secuencia de señal (SS) de translocación en el RE N-terminal, ectodominio (ED), dominio transmembrana (TM), y cola citoplasmática (CT). CT contiene un solo resto de cisteína palmitoilado. La secuencia de la proteína F está altamente conservada entre aislados de RSV, pero está en evolución constante (7). A diferencia de la mayoría de los paramixovirus, la proteína F en RSV puede mediar la entrada y la formación del sincitio independientemente de las otras proteínas virales (HN es normalmente necesaria además de F en otros paramixovirus).

El ARNm de hRSV F se traduce en una proteína precursora de 574 aminoácidos denominada F_0 , que contiene una secuencia de péptido de señal en el extremo N-terminal que se elimina mediante una peptidasa de señal en el retículo endoplasmático. F_0 se escinde en dos sitios (aminoácidos 109/110 y 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi, que eliminan una secuencia intermedia glucosilada y generando dos subunidades, denominadas F_1 (~50 kDa; extremo C-terminal; restos 137-574) y F_2 (~20 kDa; extremo N-terminal; restos 1-109) (véase, por ejemplo, la FIG. 1). F_1 contiene un péptido de fusión hidrófobo en su extremo N-terminal y también dos regiones de repetición de héptada hidrófobas (HRA y HRB). HRA está próxima al péptido de fusión y HRB está próxima al dominio transmembrana (véase, por ejemplo, la FIG. 1). Los heterodímeros F_1 - F_2 se ensamblan en forma de homotrímeros en el virión.

RSV existe en forma de un solo serotipo pero tiene dos subgrupos antigénicos: A y B. Las glucoproteínas F de los dos grupos son idénticas a aproximadamente el 90 %. El subgrupo A, el subgrupo B, o una combinación o híbrido de ambos pueden usarse en la invención. Un ejemplo de secuencia para el subgrupo A es la SEC ID N°: 1 (cepa A2; GenBank GI: 138251; Swiss Prot P03420), y para el subgrupo B es la SEC ID N°: 2 (cepa 18537; GI: 138250; Swiss Prot P13843). SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2 son ambas secuencias de 574 aminoácidos. El péptido de señal en la cepa A2 es los a.a. 1-21, pero en la cepa 18537 es 1-22. En ambas secuencias el dominio TM es entre aproximadamente los a.a. 530-550, pero como alternativa se ha comunicado como 525-548:

SEC ID N°: 1

```

1  MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE 60

61  LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARRELPRFMNYTLN 120
121  NAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSIAIAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVS 180
181  LSNGLSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNRLEITREFSVN 240
241  AGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
301  VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKV 360
361  QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT 420
421  KCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGMDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDP 480
481  LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIVILLS 540
541  LIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN 574
    
```

SEC ID N°: 2

```

1  MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNIITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE 60
61  LSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNITIN 120
121  TTKNLNVSISKKRKRRLGFLGVSIAIAGVAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVS 180
181  LSNGLSVLTSKVLDLKNYINNRLLPVNVQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLEITREFSVN 240
241  AGVTPPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
301  VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV 360
361  QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT 420
421  KCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKLEGKNLYVKGEPIINYYDP 480
481  LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIVVLLS 540
541  LIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIASF 574
    
```

5 Por lo tanto, puede encontrarse de manera natural una secuencia de aminoácidos usada con la invención en la proteína RSV F (por ejemplo, una proteína RSV F que carece de TM y de CT, aproximadamente los aminoácidos 522-574 de las SEC ID N°: 1 o 2), y/o puede tener una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones de aminoácidos individuales (inserciones, eliminaciones o sustituciones) en relación a la secuencia de RSV natural. Por ejemplo, se sabe cómo mutar

10 proteínas F para eliminar sus secuencias de escisión de furina, evitando de este modo el procesamiento intracelular. En determinadas realizaciones, la proteína RSV F carece de TM y CT (aproximadamente los aminoácidos 522-574 de las SEC ID N°: 1 o 2) y contiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones de aminoácidos individuales (inserciones, eliminaciones o sustituciones) en relación a la secuencia de RSV natural.

15 **Mutaciones de escisión de furina, de escisión de tripsina y de péptido de fusión**

Los polipéptidos o proteínas de RSV F pueden contener una o más mutaciones de aminoácidos que previenen la escisión en uno o ambos sitios de escisión de furina (es decir, los aminoácidos 109 y 136 de las SEC ID N°: 1 y 2). Estas mutaciones pueden prevenir la agregación de los polipéptidos o proteínas solubles y de este modo facilitar las purificaciones, pueden prevenir la fusión célula-célula si la proteína RSV F se expresa en la superficie de una célula,

20 tal como mediante la expresión a partir de un replicón vírico (por ejemplo, partículas de replicón de alfavirus), o si la proteína RSV F es un componente de una partícula pseudoviral. Estas mutaciones, solas o en combinación con otras mutaciones descritas en el presente documento, también pueden estabilizar la proteína en la conformación pre-fusión.

Los ejemplos de mutaciones de escisión de furina incluyen el reemplazo de los restos de aminoácidos 106 - 109 de SEC ID N°: 1 o 2 con RARK (SEC ID N°: 77), RARQ (SEC ID N°: 78), QAQN (SEC ID N°: 79), o IEGR (SEC ID N°:

25

80). Como alternativa, o además, los restos de aminoácido 133 - 136 de SEC ID N°: 1 o 2 pueden reemplazarse con RKKK (SEC ID N°: 81), ΔΔΔR, QNQN (SEC ID N°: 82), QQQR (SEC ID N°: 83) o IEGR (SEC ID N°: 80). (Δ indica que el resto de aminoácido se ha eliminado). Estas mutaciones pueden combinarse, si se desea, con otras mutaciones descritas en el presente documento, tales como mutaciones en la región p27 (aminoácidos 110-136 de las SEC ID N°: 1 o 2), incluyendo la eliminación total o parcial de la región p27.

Estas mutaciones de escisión de furina pueden combinarse, si se desea, con otras mutaciones descritas en el presente documento, tales como mutaciones de escisión de tripsina y mutaciones de péptido de fusión. Los ejemplos de mutaciones de escisión de tripsina incluyen la eliminación de cualquier resto de lisina o arginina entre aproximadamente la posición 101 y la posición 161 de las SEC ID N°: 1 o 2, o el reemplazo de cualquiera de estos restos de lisina o arginina con un aminoácido distinto de lisina o arginina. Por ejemplo, pueden sustituirse o eliminarse restos de lisina y/o arginina en la región p27 (aproximadamente los aminoácidos 110-136 de las SEC ID N°: 1 o 2), incluyendo la eliminación total o parcial de la región p27.

Como alternativa o además de las mutaciones de escisión de furina, los polipéptidos o proteínas RSV F pueden contener una o más mutaciones en la región del péptido de fusión (aminoácidos 137 y 153 de las SEC ID N°: 1 o 2). Por ejemplo, esta región puede eliminarse en su totalidad o en parte.

De acuerdo con la invención, la secuencia de restos de aminoácidos 100 - 150 del polipéptido o proteína RSV F, tal como SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, o los ectodominios solubles de la misma, es

(Delp23furdel)TPATNNRARQQQRFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 9)

En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia de restos de aminoácidos 100 - 150 del polipéptido o proteína RSV F, tal como SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, o los ectodominios solubles de la misma, es

(Furmt) TPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKRRKKKFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 3)

(Furdel) TPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNTLSK---RFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 4)

(Furx) TPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 6)

(Furx R113Q, K123N, K124N) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAANTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 5)

(Furx R113Q, K123Q, K124Q) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 92)

(Delp21Furx) TPATNNQAQN-----QNNQNFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 7)

(Delp23Furx) TPATNNQAQN----- QNNQNFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 8)

(Delp21 furdel) TPATNNRARQ----- QNQQRFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 109)

(Nterm Furin) TPATNNRARRELPQFMNYTLNNAQQTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 10)

(Cterm Furin) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTLSKRRKRRFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 11)

(eliminación 1 de péptido de fusión) TPATNNRARRELPQFMNYTLNNAKKTNTLSKRRKRRSIAIS (SEC ID N°: 12),

(eliminación 2 de péptido de fusión) TPATNNRARRELPQFMNYTLNNAKKTNTLSKRRKRR -GVGSAIAS (SEC ID N°: 91), o

(Factor Xa) TPATNNIEGRELPQFMNYTLNNAKKTNTLSKKEGRFLGFLGVSIAIS (SEC ID N°: 13); en las que el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición se ha eliminado.

Además de las mutaciones de escisión de furina y de péptido de fusión, o como alternativa, los polipéptidos o proteínas RSV F solubles, tales como aquellos que carecen de la región transmembrana y de la cola citoplasmática, pueden contener una o más secuencias de oligomerización. Cuando está presente una secuencia de oligomerización, es preferentemente una secuencia de trimerización. Las secuencias de oligomerización adecuadas se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la hélice superenrollada de la proteína de cremallera de leucina GCN4 de levadura, la secuencia trimerizante de fibritina de bacteriófago T4 ("foldon"), y el dominio de trímero de HA de la gripe. En el presente documento se describen en más detalle estas y otras secuencias de oligomerización adecuadas.

En realizaciones particulares, la secuencia del extremo carboxilo terminal del polipéptido o proteína RSV F, comenzando desde la posición 480, es

(GCN) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDHELLHNVDKIEILSKIYHIENEIARIKLLIGE (SEC ID N°: 14)

(HA) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNEKFHQIEKFSEVEGRIQDLEK (SEC ID N°: 15)

(hélice idealizada) PLVFPSEDFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNIN (SEC ID N°: 16)

(foldon corto) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEC ID N°: 17); o

5 (foldon largo)

**PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNKNDDKSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLS
TFL (SEC ID N°:18)**

Además de cualquier combinación de mutaciones de escisión de furina, mutaciones de péptido de fusión y secuencias de oligomerización añadidas, o como alternativa, los polipéptidos o proteínas RSV F que contienen una región transmembrana pueden contener una secuencia de aminoácidos añadida que proporcione un sitio de escisión de proteasa. Este tipo de polipéptido o proteína RSV F puede producirse mediante expresión en la superficie de una célula, y recuperarse en forma soluble tras la escisión de la superficie celular usando una proteasa adecuada. En general, la secuencia de aminoácidos que proporciona un sitio de escisión de proteasa se localizará a aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, o sustancialmente adyacente al extremo amino terminal del dominio transmembrana (aminoácido 525 de las SEC ID N°: 1 o 2). Se conocen bien en la técnica muchas secuencias de aminoácidos adecuadas que se escinden por proteasas comercialmente disponibles. Por ejemplo, la trombina escinde la secuencia LVPR (SEC ID N°: 75), el factor Xa escinde la secuencia IEGR y la enterocinasa escinde la secuencia DDDDK (SEC ID N°: 76). Estas secuencias de aminoácidos pueden introducirse en un polipéptido RSV F. La secuencia del polipéptido o proteína RSV F, comenzando desde la posición 488 desde la región TM es una secuencia mostrada en la FIG. 2.

Los polipéptidos inmunogénicos usados de acuerdo con la invención normalmente estarán aislados o purificados. Por lo tanto, no se asociarán con moléculas con las que normalmente, en caso adecuado, se encuentren en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína F usada con la invención no estará en forma de un virión de RSV (aunque puede estar en forma de un virión artificial, tal como un virosoma o VLP).

Los polipéptidos se prepararán generalmente mediante expresión en un sistema de hospedador recombinante. En general, estos (por ejemplo, ectodominios de RSV) se producen mediante expresión de construcciones recombinantes que codifican los ectodominios en células hospedadoras recombinantes adecuadas, aunque puede usarse cualquier procedimiento adecuado. Las células hospedadoras recombinantes adecuadas incluyen, por ejemplo, células de insecto (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*), células de mamífero (por ejemplo, ser humano, primate no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato, y roedor (por ejemplo, hámster), células de ave (por ejemplo, pollo, pato, y oca), bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus* spp.), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*), células de Tetrahymena (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de las mismas. Se conocen bien en la técnica muchas células de insecto y células de mamífero adecuadas. Las células de insecto adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células Schneider S2, y células High Five (un aislado clonal procedente de la línea celular BTI-TN-5B1-4 de *Trichoplusia ni* (Invitrogen)). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK293, típicamente transformadas con ADN de adenovirus de tipo 5 cortado), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito ECACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de resus fetal (ATCC CL-160), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón canino Madin-Darby ("MDCK") (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de cría de hámster (BHK), tales como BHK21-F, células HKCC, y similares. Las células de ave adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, células de pato (por ejemplo, las líneas celulares AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en Vaccine 27:4975-4982 (2009) y en el documento WO2005/042728), células EB66, y similares.

Los sistemas de expresión en células de insecto adecuados, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* n.º 1555 (1987). Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en baculovirus/células de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit a través de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA. Los sistemas de expresión en células de ave también son conocidos por los expertos en la materia y se describe en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; la Patente Europea n.º EP 0787180B; la Solicitud de Patente Europea n.º EP03291813.8; documentos WO 03/043415; y WO 03/076601. De igual forma, también se conocen en la técnica sistemas de expresión en

células bacterianas y de mamífero y se describen en, *por ejemplo*, Yeast Genetic Engineering (Barr y col., eds., 1989) Butterworths, Londres.

5 Las construcciones recombinantes que codifican ectodominios de proteína RSV F pueden prepararse en vectores adecuados usando procedimientos convencionales. Se conocen bien y son convencionales en la técnica una serie de vectores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto o de mamífero. Los vectores adecuados pueden incluir una serie de componentes, incluyendo, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen de marcador de selección; uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador), y/o una o más señales de traducción; y una secuencia de señal o secuencia líder para dirigirse a la ruta secretora en una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, de origen de mamífero o de un mamífero heterólogo o una especie no de mamífero). Por ejemplo, para la expresión en células de insecto, se usa un vector de expresión de baculovirus, tal como pFastBac (Invitrogen) para producir partículas de baculovirus recombinantes. Las partículas de baculovirus se amplifican y usan para infectar células de insectos para expresar proteína recombinante. Para la expresión en células de mamífero, se usa un vector que dirigirá la expresión de la construcción en la célula hospedadora de mamífero deseada (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).

10 Los polipéptidos de ectodominio de la proteína RSV F pueden purificarse usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, se conocen en la técnica procedimientos para purificar polipéptidos de ectodominio de RSV F mediante cromatografía de inmunoafinidad. Ruiz-Arguello y col., J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004). Los procedimientos adecuados para purificar proteínas deseadas, incluyendo precipitación y diversos tipos de cromatografía, tales como de interacción hidrófoba, de intercambio iónico, de afinidad, quelante y de exclusión por tamaño se conocen bien en la técnica. Pueden crearse esquemas de purificación adecuados usando dos o más de estos u otros procedimientos adecuados. Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F pueden incluir un "marcador" que facilite la purificación, tal como un marcador epitópico o un marcador HIS. Dichos polipéptidos marcados pueden purificarse de manera conveniente, por ejemplo, a partir de medio condicionado, mediante cromatografía quelante o
20 cromatografía de afinidad.

25 Los polipéptidos de RSV F también pueden producirse *in situ* mediante expresión de ácidos nucleicos que los codifican en las células de un sujeto. Por ejemplo, mediante la expresión de un ARN autorreplicante descrito en el presente documento.

30 Los polipéptidos pueden incluir secuencias adicionales, además de las secuencias de RSV. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir una secuencia para facilitar la purificación (por ejemplo, una secuencia de poli-His). De igual forma, para fines diagnósticos, puede sustituirse el péptido líder natural de la proteína F por otro diferente. Por ejemplo, la referencia 6 usó un péptido líder de melitina de la abeja melífera en lugar del natural.

Forma y conformación de polipéptidos

35 La invención incluye composiciones inmunogénicas que incluyen cualquiera de las formas y conformaciones de los polipéptidos de RSV F y de las proteínas desveladas en el presente documento, incluyendo cualquier combinación deseada de las formas y conformaciones de los polipéptidos de RSV F y de las proteínas desveladas en el presente documento. El polipéptido de RSV F puede ser un monómero, o la proteína RSV F puede ser un trímero que comprende tres péptidos monoméricos. Los trímeros pueden ser monodispersos o pueden estar en forma de una roseta, por ejemplo, debido a interacciones entre los péptidos de fusión de trímeros individuales. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender polipéptidos que son monómeros, trímeros, una combinación de monómeros y trímeros (por ejemplo, en equilibrio dinámico), rosetas de trímeros, y cualquier combinación de los anteriores. Además, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la proteína RSV F puede estar en una conformación post-fusión, una conformación pre-fusión, o una conformación intermedia.

40 La proteína RSV F puede estar en una conformación pre-fusión, una conformación post-fusión o en una conformación intermedia. Se cree que la "conformación post-fusión" de la proteína RSV F es la conformación de baja energía de RSV F nativa, y es un trímero caracterizado por la presencia de un nudo de seis hélices que comprende 3 regiones HRB y 3 HRA. La conformación post-fusión tiene una forma característica de "muleta" o "tee de golf" mediante microscopía electrónica. La "conformación pre-fusión" de la proteína RSV F es una conformación caracterizada por un trímero que contiene una hélice superenrollada que comprende 3 regiones HRB. El péptido de fusión no está expuesto en la conformación pre-fusión y, por lo tanto, las conformaciones pre-fusión no forman generalmente rosetas, y tienen una forma de "chupachups" o de "bola y tallo" mediante microscopía electrónica.

45 En algunos aspectos, la proteína RSV F está en la conformación post-fusión. Por ejemplo, la proteína RSV F puede estar en forma de un trímero monodisperso en la conformación post-fusión, o en forma de una roseta compuesta de trímeros post-fusión.

55 En algunas realizaciones, el polipéptido de RSV F es un monómero. En algunas realizaciones, el polipéptido de RSV F es un trímero.

En otros aspectos, la proteína RSV F está en la conformación pre-fusión. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que la conformación pre-fusión o las formas intermedias de la proteína RSV F pueden contener

epítopos que son los mismos que aquellos en la proteína RSV F expresada en viriones de RSV naturales, y por lo tanto proporcionan ventajas para suscitar anticuerpos neutralizantes.

Algunos aspectos de la invención usan un polipéptido que desfavorece la conformación post-fusión de la proteína F. Preferentemente, los polipéptidos (en su totalidad o en parte) mostrarán un epítipo de la proteína F pre-fusión o cualquier epítipo de una conformación intermedia en la conversión desde la conformación pre-fusión a la conformación post-fusión. Estos polipéptidos pueden ser proteínas F nativas o mutadas en un estado pre-fusión, pueden ser proteínas F nativas o mutadas en una conformación intermedia, o pueden ser una población de proteínas nativas o mutadas donde se ha desfavorecido o preferentemente excluido la conformación post-fusión. En determinados casos, la proteína nativa o mutada puede combinarse con una o más moléculas adicionales que asisten en el mantenimiento de los polipéptidos en uno de los estados anteriores, tales como un anticuerpo monoclonal que se une preferentemente a la conformación pre-fusión o a una conformación intermedia. Además, los polipéptidos pueden ser derivados de proteínas F nativas. Dichos derivados incluyen polipéptidos que comprenden uno o más fragmentos de una proteína F nativa, polipéptidos de fusión que comprenden una proteína F nativa (o un fragmento de la misma) y una secuencia heteróloga, y polipéptidos que comprenden una secuencia de proteína F nativa que tiene una o más mutaciones. Estas (u otras) modificaciones pueden desfavorecer la conformación post-fusión. Las estrategias ejemplares para desfavorecer la conformación post-fusión incluyen la estabilización de la conformación pre-fusión, estabilizar una conformación intermedia, desestabilizar la conformación post-fusión o aumentar la barrera de activación de una o más etapas que den lugar a la conformación post-fusión.

En otra realización, la invención es un polipéptido que muestra al menos un epítipo que es específico de la proteína F con conformación pre-fusión o una proteína F con conformación intermedia. Un epítipo que sea específico a la proteína F en conformación pre-fusión o una proteína F en conformación intermedia es un epítipo que no se presenta en la conformación post-fusión. Se prefiere que se presente al menos un epítipo de manera estable, *por ejemplo*, el epítipo se presenta de manera estable en solución durante al menos doce horas, al menos un día, al menos dos días, al menos cuatro días, al menos seis días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, o al menos seis semanas.

Dichos polipéptidos pueden ser proteínas F nativas o mutadas en el estado pre-fusión, en un estado intermedio o en una población de estados donde el estado post-fusión está menos representado o en un porcentaje menor que para las proteínas F nativas aisladas, o puede ser un derivado de una proteína F nativa. Dichos derivados incluyen polipéptidos que comprenden uno o más fragmentos de una proteína F nativa, polipéptidos de fusión que comprenden una proteína F nativa (o un fragmento de la misma) y una secuencia heteróloga, y polipéptidos que comprenden una secuencia de proteína F nativa que tiene una o más mutaciones. Estas (u otras) modificaciones pueden estabilizar una secuencia de aminoácidos de proteína F en su conformación pre-fusión, estabilizar una secuencia de aminoácidos de proteína F en una conformación intermedia, desestabilizar la conformación post-fusión de una secuencia de aminoácidos de proteína F, aumentar la barrera de energía en una transición que dé lugar a la conformación post-fusión de una secuencia de aminoácidos de proteína F, o una combinación de dos o más de los anteriores.

Los dominios TM y/o CT de las proteínas F son importantes para la estabilidad de la conformación pre-fusión (8). Por lo tanto, estos dominios pueden retenerse de manera útil en los inmunógenos de la invención. Ya que puede ser deseable no incluir dominios transmembrana en los inmunógenos solubles, sin embargo, el efecto funcional de TM puede lograrse por otros medios. Por ejemplo, se ha estudiado con cierto grado de detalle el comportamiento pre y post-fusión de la proteína F del virus 5 de parainfluenza (6), y los autores estabilizaron la estructura pre-fusión de ED fusionando un dominio de trimerización heterólogo al extremo C-terminal del ED.

Dominio de oligomerización

En otra realización de la invención, la composición puede comprender un polipéptido (por ejemplo, polipéptido recombinante) que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en la que (i) el primer dominio comprende la proteína RSV F (por ejemplo, ectodominio de RSV, en su totalidad o en parte), y (ii) el segundo dominio comprende un dominio de oligomerización heterólogo. El segundo dominio permite la oligomerización del polipéptido, facilitando de este modo que el primer dominio adopte un estado pre-fusión o un estado intermedio. El polipéptido estará presente preferentemente en forma de un oligómero, y en particular en forma de un trímero.

Hay varios dominios de oligomerización disponibles para el experto en la materia. Estos son secuencias de aminoácidos que pueden formar una estructura que puede interactuar con dominios de oligomerización (ya sean los mismos o diferentes) en otros polipéptidos (ya sean iguales o diferentes) de tal forma que múltiples polipéptidos pueden asociarse (normalmente de manera no covalente) para formar oligómeros, por ejemplo, trímeros. Por ejemplo, se ha logrado la trimerización de la proteína F de VIH (por ejemplo, gp160) fusionándola a la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamoylase de *E. coli* (ATCasa), que es un trímero estable de manera natural (9). Por lo tanto, esta subunidad de ATCasa puede usarse con la presente invención. De igual forma, se ha logrado la trimerización de las proteínas F de VIH (10) y PIV5 (6) fusionando sus ectodominios a GCNT. Por lo tanto, el dominio de oligomerización usado con la presente invención puede comprender la hélice superenrollada de la proteína de cremallera de leucina GCN4 de levadura (11). La trimerización del ectodominio de la proteína HA del virus de la gripe A se ha logrado usando una secuencia trimerizante ('foldon') de fibritina de bacteriófago T4

(GSGYIPEAPRDGQ AYVRKDGWVLLSTFL - SEC ID N°: 19) (12). Por lo tanto, el dominio de oligomerización usado con la presente invención puede comprender dicho foldon.

Los oligómeros de proteína de origen natural (tanto hetero-oligómeros como homo-oligómeros) se asocian de una diversidad de formas distintas, por ejemplo, mediante asociación β -láminas en diferentes monómeros, mediante asociación de α -hélices en diferentes monómeros, mediante asociación de parches de superficie hidrófobos, etc. Un motivo estructural común implicado en la oligomerización de proteínas es el dominio de hélice superenrollada. El motivo estructural de α -hélice enrollada puede formar por sí mismo hélices, y dos, tres, cuatro o cinco α -hélices pueden enrollarse alrededor unas de otras para formar una súper hélice levógira conocida como "hélice superenrollada" aunque se han diseñado súper hélices dextrógiras artificiales (13-19). La simplicidad del dominio de hélice superenrollada la ha convertido en una elección popular para diseñar proteínas químicas con estados de oligomerización definidos (16).

En una estructura de hélice superenrollada las α -hélices interactúan a través de restos hidrófobos que forman una banda apolar a lo largo de un lateral de cada hélice, y también puede haber interacciones electrostáticas estabilizantes entre cadenas laterales en cualquiera de los lados de esta banda. En una repetición de héptada de abcdefg de una α -hélice, la banda apolar está definida por cadenas laterales hidrófobas en los restos a y d, encontrándose cualquier interacción electrostática principalmente en los restos e y g. La posición a es con mayor frecuencia Leu, Ile o Ala y la posición d es normalmente Leu o Ala. Los restos e y g a menudo son Glu o Gln, siendo Arg y Lys también prominentes en la posición g. Los restos cargados son comunes en las posiciones b, c y f ya que estos restos están en contacto con el disolvente. Hay excepciones a este patrón general de la héptada, sin embargo, y en ocasiones se encuentran restos de Pro en la héptada. Dichas excepciones normalmente tienen un significado funcional incluyendo, a modo de ejemplo, la desestabilización del dominio de oligomerización para permitir el repliegamiento y la reorganización tal como sucede en la proteína F.

Se conocen en la técnica cientos de secuencias de dominio de hélice superenrollada, y puede usarse cualquier secuencia adecuada como dominio de oligomerización en la invención, siempre que mantenga la capacidad para formar oligómeros con otros dominios de hélice superenrollada y que no destruya la función de los demás dominios en el polipéptido. Se prefiere usar un dominio de hélice superenrollada que se encuentre de manera extracelular (20) y que actúe de manera natural como dominio de oligomerización. Como alternativa al uso de un dominio de hélice superenrollada, pueden usarse dominios de hélice superenrollada artificiales (21, 22). Debido a la estructura altamente repetitiva de un dominio de hélice superenrollada, el dominio es particularmente susceptible de ser modelado por ordenador ya que las porciones estructurales de cada resto de aminoácido puede parametrizarse en lugar de tratar cada porción de armazón de un resto como una unidad única con sus propias variables. El dominio (b) puede incluir una secuencia de cremallera de leucina o una secuencia de cremallera de alanina (23).

El dominio de hélice superenrollada usado en el polipéptido de la invención es preferentemente uno que forma un trímero, de tal forma que el polipéptido de la invención también puede ensamblarse en un trímero. Los dominios de hélice superenrollada preferidos son aquellos que se toman de proteínas transmembrana bacterianas. Un subconjunto de proteínas transmembrana preferidas es el de las adhesinas (es decir, proteínas de la superficie celular que median la adhesión a otras células o a superficies), y en particular las adhesinas no fimbriales (por ejemplo, en la familia de adhesinas superenrolladas de oligomerización, u "oca"). Las secuencias específicas para su uso con la invención incluyen aquellas divulgadas en la referencia 24 de adhesina YadA de *Yersinia enterocolitica*, adhesina NadA de *Neisseria meningitidis*, proteína de superficie UspA2 de *Moraxella catarrhalis*, y otras adhesinas, tales como la adhesina HadA del biogrupo *aegyptius* de *Haemophilus influenzae*, etc (SEC ID N°: 28-31 y 42-58 de la ref. 24). Además, el factor de transcripción de choque térmico de eucariotas tiene un dominio de trimerización de hélice superenrollada que puede expresarse por separado y por lo tanto usarse con la invención.

Dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene una región de hélice superenrollada, la naturaleza de la repetición de héptadas de las α -hélices significa que el límite del dominio de hélice superenrollada puede determinarse con cierto grado de precisión, pero puede no conocerse con precisión absoluta el resto exacto donde puede decirse que termina la disposición de hélice superenrollada. Esta ausencia de precisión absoluta no es un problema para poner en práctica la invención, sin embargo, ya que los ensayos rutinarios pueden revelar si la hélice superenrollada requiere de cualquier resto de aminoácido concreto para el que pueda haber dudas. Incluso en este caso, la invención no requiere que se conozcan los límites con precisión absoluta, ya que el único requisito básico para la invención es que el dominio de hélice superenrollada funcione de tal modo que permita que el polipéptido forme oligómeros con otros dominios de hélice superenrollada sin destruir la función de otros dominios en el polipéptido.

Otra clase de dominio de oligomerización que puede usarse con la invención se encuentra en la triple hélice dextrógira conocida como la hélice de colágeno (25). Estas secuencias formadoras de triple hélice implican una secuencia repetida básica de tripéptido de $^1\text{Gly-}^2\text{Xaa-}^3\text{Xaa}$, donde ^2Xaa es a menudo Pro, y ^3Xaa es a menudo 4-hidroxiprolina. Aunque este motivo se conoce como la hélice de "colágeno", se encuentra en muchas proteínas aparte solo en el colágeno. El dominio de oligomerización puede ser por lo tanto una secuencia que comprende múltiples repeticiones del motivo de secuencia $^1\text{Gly-}^2\text{Xaa-}^3\text{Xaa}$, plegándose este motivo para formar una estructura helicoidal que puede formar oligómeros con estructuras helicoidales correspondientes en otras cadenas polipeptídicas.

El colágeno también proporciona otra clase de dominio de oligomerización. La referencia 26 describe un motivo encontrado en el dominio 1 no colagenoso (NC1) del colágeno de tipo X, y este motivo puede usarse para la formación de trímeros y multímeros de mayor orden sin una triple hélice. Esta asociación trimérica es altamente termoestable sin enlaces disulfuro intermoleculares. Por lo tanto, el dominio de oligomerización puede comprender una secuencia NCI.

Otros dominios de oligomerización pueden proceder de los dominios transmembrana de proteínas TM oligoméricas. Ya que estas son normalmente lipófilas, los restos hidrófobos situados en el exterior de sus regiones TM pueden sustituirse por restos cargados, para proporcionar un dominio soluble. Dichos procedimientos para solubilizar dominios transmembrana por ingeniería genética de proteína se conocen en la técnica, por ejemplo, a partir de la referencia 27. Este procedimiento también se ha usado para GCN4, donde las posiciones "a" y "d" de la repetición de la héptada se reemplazaron con isoleucina (11):

KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA (SEC ID N°: 20). Las secuencias de hélice superenrollada adecuadas para su uso en el dominio de oligomerización tendrán normalmente entre 20 y 35 aminoácidos de longitud, *por ejemplo*, de 23 a 30 restos de aminoácidos de longitud.

Los dominios de oligomerización usados con la invención pueden mantener generalmente una estructura oligomérica sin la necesidad de la formación de puentes disulfuro entre monómeros, pero no se excluyen de la invención oligómeros que contienen monómeros unidos mediante disulfuro.

Como alternativa, o además de usar un dominio de oligomerización para estabilizar la proteína F en su conformación pre-fusión, puede usarse mutación. Por ejemplo, la referencia 28 comunica que la mutación en una región conservada de la subunidad F2 de las proteínas F en el virus 5 de simio o del virus hendra puede influenciar la estabilidad de la conformación pre-fusión.

En algunas circunstancias también puede usarse un pH bajo para favorecer la conformación pre-fusión.

Estabilización del trímero de dominio HRB

En otro aspecto preferido de la presente invención, la conformación post-fusión de la proteína F puede verse desfavorecida por la estabilización del trímero de dominio HRB. El dominio HRB forma una hélice superenrollada de tres hebras en la forma de pre-fusión y probablemente en la intermedia. Tal como se ha discutido en la sección precedente, debido a su simplicidad, las hélices superenrolladas se han estudiado exhaustivamente como sistemas modelo para interacciones intermoleculares entre proteínas y como sistemas modelo para interacciones intramoleculares de espectro más amplio (es decir, interacciones de plegamiento terciario). Estos estudios son útiles para enseñar los procedimientos que pueden usarse para estabilizar el dominio HRB en la forma de hélice superenrollada trimérica. A modo de ejemplo, pueden reemplazarse uno o más restos de las posiciones a y/o d de la repetición de héptada con restos que favorecen la formación de hélices superenrolladas triméricas estables, tales como restos de Ile. Además, aunque menos preferidos, pueden eliminarse interacciones iónicas desfavorables en las posiciones e y g o pueden añadirse interacciones iónicas favorables en las posiciones e y g.

La región preferida del dominio HRB para la manipulación es la repetición de héptada entre P484-N517. Los ejemplos preferidos de restos de a y d como diana para mutaciones son F488, I492, V495, I499, S502, I506, S509, L512, y V516. Los restos de serina se prefieren especialmente ya que el reemplazo de restos hidrófilos con restos hidrófobos podría estabilizar el núcleo hidrófobo de la hélice superenrollada. Otra diana preferida podría ser la fenilalanina con un resto hidrófobo más pequeño que podría empaquetarse mejor en el núcleo, tal como una isoleucina.

Desestabilización del trímero de dominio HRA

En otro aspecto preferido de la presente invención, la conformación post-fusión de la proteína F puede verse desfavorecida por la desestabilización del trímero de dominio HRA. El dominio HRA forma una hélice superenrollada de tres hebras en la forma post-fusión y posiblemente una o más formas intermedias. A modo de ejemplo, pueden reemplazarse uno o más restos de las posiciones a y/o d de la repetición de héptada con restos que desfavorecen la formación de hélices superenrolladas triméricas estables. Además, aunque menos preferidos, pueden eliminarse interacciones iónicas favorables en las posiciones e y g o pueden añadirse interacciones iónicas desfavorables en las posiciones e y g. Preferentemente, dichas mutaciones se seleccionarán de tal modo que tengan un impacto mínimo en la estabilidad del dominio HRA en la conformación pre-fusión tal como puede modelarse basándose en las estructuras cristalinas disponibles de la proteína PIV5 F en las formas pre-fusión y post-fusión.

Otras modificaciones

Además de las modificaciones anteriores, pueden diseñarse además modificaciones basándose en el modelado molecular de las proteínas hRSV F basándose en las estructuras cristalinas disponibles de la proteína PIV5 F en las formas de pre-fusión y post-fusión. Pueden efectuarse mutaciones que desestabilicen la conformación post-fusión, tales como el plegamiento 6HB de los dominios HRA y HRB o que estabilicen la conformación pre-fusión, tal como el plegamiento HRA en la conformación pre-fusión. Además, puede aumentarse la barrera de energía de las

transiciones que dan lugar a la conformación post-fusión. Aunque un experto en la materia apreciará que la estabilización de la conformación inicial o la desestabilización de la conformación final pueden tener el efecto de aumentar la barrera de energía, pueden introducirse otras modificaciones que afecten al estado de transición en sí mismo.

- 5 Como ejemplo adicional, los aminoácidos N-terminales del dominio HRB (aproximadamente los a.a. 449-482, preferentemente V459-F483) actúan como "anclaje" que permiten que el dominio HRB cambie de un lado del trímero de la proteína F al otro lado de tal forma que el dominio HRB pueda participar en el 6HB de la conformación post-fusión.

10 La eliminación de uno o más de estos aminoácidos impedirá o prevendrá directamente la participación del dominio HRB en el plegamiento 6HB de la conformación post-fusión de la proteína F (véase la figura 3). Además, la interacción entre el anclaje y la proteína F en la conformación pre-fusión puede estabilizarse para prevenir que tire el anclaje para permitir que el dominio HRB participe en el plegamiento 6HB. Los ejemplos de mutaciones estabilizantes que pueden producirse son puentes de cisteína entre el anclaje y la porción de la proteína F con la que el anclaje entra en contacto en la conformación pre-fusión.

15 Otro ejemplo más es la estabilización del HRA en la conformación pre-fusión (restos T50-Y306). Igualmente, basándose en las estructuras cristalinas de proteínas F homólogas, el núcleo hidrófobo puede estabilizarse reemplazando restos hidrófilos o iónicos enterrados con restos hidrófobos de tamaño similar. También, pueden introducirse puentes de cisteína en la superficie o en el núcleo. Además, tal como se demostró mediante un análisis exhaustivo de la estructura cristalina de mutantes de lisozima, los núcleos hidrófobos de las proteínas son
20 relativamente rígidos y por lo tanto la introducción de agujeros desestabilizó de manera predecible a los mutantes de lisozima. De igual forma, el reempaquetamiento del núcleo de la proteína F en la conformación pre-fusión para eliminar cualquier agujero natural estabiliza a la proteína F en las formas pre-fusión o intermedias, de este modo desfavoreciendo la conformación post-fusión.

Procedimientos para preparar composiciones

25 La divulgación se refiere a procedimientos para preparar composiciones y a composiciones que comprenden proteína RSV F, en particular polipéptidos de ectodominio de RSV F solubles, incluyendo composiciones inmunogénicas. Preferentemente, los polipéptidos de ectodominio de RSV F se encuentran en una sola forma, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos, o en un equilibrio dinámico entre un subconjunto de dichas formas (por ejemplo, equilibrio entre monómeros no
30 escindidos y trímeros escindidos). La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, como se describen en este documento, la invención proporciona procedimientos para producir composiciones que contienen una forma deseada predominante de la proteína RSV F, o una sola forma deseada de la proteína RSV F, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos, un equilibrio dinámico entre un subconjunto de dichas formas (por ejemplo, equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros escindidos), o
35 una mezcla de formas deseadas de la proteína RSV F. Estos tipos de composiciones pueden usarse para una diversidad de fines, tales como, en la producción de composiciones inmunogénicas que pueden usarse para producir vacunas. La presencia de una sola forma deseada de RSV F, o de un equilibrio dinámico entre formas conocidas, en una composición inmunogénica, proporciona una formulación, solubilidad y estabilidad más predecibles, y una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto.

40 Cuando los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se producen mediante expresión recombinante convencional en células hospedadoras, los polipéptidos se escinden en los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 109/110 y aproximadamente en la posición 136/137 durante la producción en la célula hospedadora antes de que se secreten al medio de cultivo. La escisión de los polipéptidos por las células permite el plegamiento del polipéptido de ectodominio de proteína RSV F, lo que da como resultado la exposición del péptido de fusión hidrófobo. Por consiguiente, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos,
45 debido a la presencia de un péptido de fusión expuesto, forman rosetas y se asocian con lípidos y lipoproteínas que proceden de las células hospedadoras y del medio de cultivo. De hecho, la microscopía electrónica de ectodominios de RSV F que se producen en células de insecto y se purifican mediante un marcador HIS₆ mostró que los polipéptidos tenían una forma de muleta, coherente con una forma post-fusión y se unieron a lo que parecían ser restos celulares residuales. Por consiguiente, no pueden obtenerse fácilmente preparaciones de alta pureza de rosetas y otras formas y conformaciones de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F mediante expresión
50 recombinante convencional en células hospedadoras.

Procedimientos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos

55 En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos. En general, el procedimiento implica proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos y después escindirlos para producir una subunidad F₁ y una subunidad F₂. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos pueden purificarse y separarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas contaminantes usando procedimientos adecuados, tal como cromatografía de exclusión por tamaño. Sin desear quedar ligado a ninguna

teoría concreta, se cree que el péptido de fusión hidrófobo no está expuesto en los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos y, por lo tanto, los polipéptidos no escindidos no se asocian con lípidos y lipoproteínas contaminantes. Tal como se describe además en el presente documento, los ectodominios de proteína RSV F no escindidos pueden escindir-se para producir subunidades F_1 y F_2 , que pueden purificarse en forma de trímeros, rosetas de trímeros, o una mezcla de trímeros y rosetas de trímeros.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos pueden producirse usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, mediante producción recombinante en células hospedadoras que no contienen furina o proteasas similares a furina en el momento en que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se están produciendo. Puede usarse una diversidad de procedimientos para lograr este procedimiento de producción, tales como, producción en células hospedadoras recombinantes que se mutan para evitar la expresión de furina o proteasas similares a furina (de manera condicional o "knockout" completo), y diversos procedimientos que reducen o previenen la expresión de furina o proteasas similares a furina en las células hospedadoras, por ejemplo, usando interferencia de ARN u otros procedimientos similares, o inhibiendo la actividad de furina o de proteasas similares a furina en células hospedadoras usando inhibidores de las proteasas.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos se producen preferentemente mediante expresión recombinante de construcciones que codifican un ectodominio de proteína RSV F en el que están alteradas las secuencias de aminoácidos de los sitios de escisión de furina, de tal forma que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan por una célula hospedadora que produce los polipéptidos no escindidos. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos pueden producirse usando cualquier célula hospedadora adecuada, tales como células de insecto (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*), células de mamífero (por ejemplo, ser humano, primate no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato, y roedor (por ejemplo, hámster), células de ave (por ejemplo, pollo, pato, y oca), bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus* spp.), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*), células de Tetrahymena (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de las mismas. Se conocen bien en la técnica muchas células de insecto y células de mamífero adecuadas. Las células de insecto adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células Schneider S2, y células High Five (un aislado clonal procedente de la línea celular BTI-TN-5B1-4 de *Trichoplusia ni* (Invitrogen)). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK293, típicamente transformadas con ADN de adenovirus de tipo 5 cortado), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito ECACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de resus fetal (ATCC CL-160), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón canino Madin-Darby ("MDCK") (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de cría de hámster (BHK), tales como BHK21-F, células HKCC, y similares. Las células de ave adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, células de pato (por ejemplo, las líneas celulares AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en Vaccine 27:4975-4982 (2009) y en el documento WO2005/042728), células EB66, y similares.

Los sistemas de expresión en células de insecto adecuados, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos por los expertos en la materia y se describen en, *por ejemplo*, Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* n.º 1555 (1987). Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en baculovirus/células de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit a través de, *entre otras cosas*, Invitrogen, San Diego CA. Los sistemas de expresión en células de ave también son conocidos por los expertos en la materia y se describe en, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; la Patente Europea n.º EP 0787180B; la Solicitud de Patente Europea n.º EP03291813.8; documentos WO 03/043415; y WO 03/076601. De igual forma, también se conocen en la técnica sistemas de expresión en células bacterianas y de mamífero y se describen en, *por ejemplo*, Yeast Genetic Engineering (Barr y col., eds., 1989) Butterworths, Londres.

En general, la secuencia de aminoácidos de un ectodominio de proteína RSV F no escindido se altera para prevenir la escisión en los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 109/110 y aproximadamente en la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de proteasa de origen natural o introducir, que cuando se escinde produce una subunidad F_1 y una subunidad F_2 . Por ejemplo, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido puede tener una secuencia de aminoácidos que esté alterada para prevenir la escisión en los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 109/110 y aproximadamente en la posición 136/137, pero contener uno o más sitios de escisión de proteasas de origen natural o introducidos entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161.

Pueden diseñarse fácilmente y preverse por un experto habitual en la materia una diversidad de secuencias de aminoácidos particulares que permitirán que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos se produzcan y expresen por células hospedadoras, incluyendo secuencias de aminoácidos que no se escinden en los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 109/110 y aproximadamente en la posición 136/137. En general, se reemplazan o eliminan uno o más aminoácidos que forman parte de, o se localizan próximos a, los sitios

de escisión de furina aproximadamente en la posición 109/110 y aproximadamente en la posición 136/137. Se conocen algunas sustituciones y eliminaciones de aminoácidos que son adecuadas para prevenir la escisión de los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F. Por ejemplo, las sustituciones R108N, R109N, R108N/R109N, que inhiben la escisión en 109/110, y la sustitución K131Q o la eliminación de los aminoácidos en las posiciones 131-134, que inhiben la escisión en 136/137, se han descrito por Gonzalez-Reyes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9859-9864 (2001). Se ha descrito un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido que contiene las sustituciones de aminoácidos R108N/R109N/ K131Q/R133Q/ R135Q/R136Q. Ruiz-Argüello y col., J. Gen. Virol. 85:3677687 (2004). Tal como se describe detalladamente en el presente documento, las secuencias de aminoácidos de proteína RSV F adicionales que dan como resultado la secreción del polipéptido de ectodominio de RSV F por la célula hospedadora sin escindir contienen sitios de escisión de furina alterados, por ejemplo, alteración de las secuencias de aminoácidos aproximadamente en las posiciones 106-109 y aproximadamente en las posiciones 133-136. Los sitios de escisión de furina alterados contienen al menos una sustitución o eliminación de aminoácidos aproximadamente en las posiciones 106-109, y al menos una sustitución o eliminación de aminoácidos aproximadamente en las posiciones 133-136.

De manera similar, son posibles y pueden diseñarse y preverse fácilmente una diversidad de secuencias de aminoácidos particulares de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos que contienen un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, de origen natural o introducido) que cuando se escinden producen una primera subunidad que comprende F_1 y una segunda subunidad que comprende F_2 . Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína RSV F entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 contiene sitios de escisión de tripsina, y uno o más de los sitios de escisión de tripsina pueden escindirse con tripsina para generar subunidades F_1 y F_2 . Si se desea, pueden introducirse uno o más sitios de reconocimiento de proteasas adecuados en el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido, por ejemplo, entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161. Los sitios de reconocimiento de proteasas pueden escindirse usando la proteasa adecuada para generar subunidades F_1 y F_2 . Cuando se introduce un sitio de reconocimiento de proteasa en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido, se prefiere que el sitio se reconozca por una proteasa que no escinda el ectodominio de la proteína RSV F de origen natural.

El procedimiento de este aspecto de la divulgación incluye: a) proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos que contengan un sitio de escisión de proteasa que, cuando se escinde, produce subunidades F_1 y F_2 , y b) escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos con una proteasa que reconoce al sitio de escisión de proteasa. En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de RSV F no escindidos contiene sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan de una célula hospedadora que los produce sin escindir en los sitios de escisión de furina aproximadamente en las posiciones 106-109 y aproximadamente en las posiciones 131-136.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados pueden purificarse hasta un grado deseado. Por ejemplo, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados pueden proporcionarse en forma de un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular que está sustancialmente sin procesar (por ejemplo, sin procesar, o solo rebajado), o en forma parcial o sustancialmente purificada. En ejemplos particulares, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos se proporcionan en medio de condicionado de cultivo celular seleccionado entre el grupo que consiste en medio condicionado de células de insecto, medio condicionado de células de mamífero, medio condicionado de células de ave, medio condicionado de células de levadura, medio condicionado de células de Tetrahymena, y combinaciones de los mismos.

Generalmente se prefiere que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados estén purificados, por ejemplo, purificados hasta al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, mientras que las formas escindidas producidas de manera convencional de la proteína RSV F se purifican conjuntamente con lípidos y lipoproteínas contaminantes. Por consiguiente, cuando se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos purificados, puede usarse el procedimiento para producir fácilmente una composición que contenga ectodominios de proteína RSV F escindidos que esté sustancialmente libre de lípidos o lipoproteínas.

Los procedimientos adecuados para escindir polipéptidos usando una proteasa se conocen bien y son convencionales en la técnica. En general, los polipéptidos que van a escindirse se combinan con una cantidad suficiente de proteasa en condiciones (por ejemplo, pH, concentración de polipéptido y proteasa, temperatura) adecuadas para la escisión del polipéptido. Hay disponibles comercialmente muchas proteasas adecuadas, y las condiciones adecuadas para llevar a cabo la escisión de polipéptidos se conocen bien para muchas proteasas. Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos pueden purificarse después de la escisión con proteasa.

En un ejemplo del procedimiento, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos que contienen un péptido de fusión intacto, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en el

que no se ha sustituido o eliminado ninguno de los aminoácidos entre las posiciones 137-154. En algunas realizaciones, se purifican los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados que contienen un péptido de fusión intacto se escinden, y la escisión da como resultado la formación de rosetas de trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F escindido. Si se desea, las rosetas pueden purificarse adicionalmente usando cualquier procedimiento adecuado, tal como cromatografía de exclusión por tamaño.

En otro ejemplo del procedimiento, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos que contienen un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en el que los aminoácidos aproximadamente 137-152, aproximadamente los aminoácidos 137-153, aproximadamente los aminoácidos 137-145 o aproximadamente los aminoácidos 137-142 están eliminados. También se han descrito otras eliminaciones de péptido de fusión adecuadas, tales como la eliminación de los aminoácidos en las posiciones 137-146. Ruiz-Arguello y col., J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004).

En algunas realizaciones, se purifican los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos se escinden, y la escisión da como resultado la formación de trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos. Si se desea, los trímeros pueden purificarse adicionalmente usando cualquier procedimiento adecuado, tal como cromatografía de exclusión por tamaño.

En ejemplos particulares del procedimiento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos proporcionados contienen al menos un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en furdel y delp23 furdel (por ejemplo, furdel homogéneo escindible por tripsina, delp23 furdel homogéneo escindible por tripsina, o una mezcla de furdel escindible por tripsina y delp23 furdel escindible por tripsina). Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos se escinden, por ejemplo con tripsina, y la escisión da como resultado la formación de trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos, o una combinación de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F. Si se desea, los trímeros escindidos y/o rosetas de trímeros escindidos pueden purificarse adicionalmente usando cualquier procedimiento adecuado, tal como cromatografía de exclusión por tamaño.

Procedimientos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos

En otro aspecto, la divulgación es un procedimiento para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. En general, el procedimiento implica proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, tal como un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular, y después purificar los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. Tal como se describe en el presente documento, se ha descubierto que los monómeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido purificados pueden autoasociarse para formar trímeros no escindidos, y que hay una mezcla de monómeros no escindidos y de trímeros no escindidos o un equilibrio entre los monómeros no escindidos y los trímeros no escindidos. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que el equilibrio favorece al monómero, pero que el equilibrio se desplazará hacia el trímero en soluciones concentradas.

El procedimiento de este aspecto de la divulgación incluye a) proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, tal como un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular; y b) purificar los monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido a partir del material biológico. En algunas realizaciones, se purifican los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, o se purifican los trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, o se purifican los monómeros y trímeros.

En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de RSV F no escindidos contiene sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan por una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 (incluyendo en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). El material biológico que contiene polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido incluye delp23 furdel. El material biológico también puede contener polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos; incluyendo al menos un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en furmt, furdel, delp21 furx, delp23 furx, delp21 furdel, y la construcción de factor Xa, que puede escindir usando factor Xa.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ectodominio de RSV F contiene sitios de escisión de furina alterados, y otros sitios de escisión de proteasas (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se alteran o eliminan para prevenir la escisión por proteasas (por ejemplo, tripsina). Por ejemplo, es bien conocido que la tripsina escinde después de restos de lisina y arginina. En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ectodominio de RSV F no escindido contiene sitios de escisión de furina alterados, uno o más restos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los restos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y

aproximadamente la posición 161 se eliminan o reemplazan con un aminoácido que no es lisina o arginina, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan por una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161. Preferentemente, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no se escinden por tripsina cuando se trata una solución de 1 mg/ml de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F (diluida en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM) con un volumen uno-mil de solución de tripsina (tripsina de plasma bovino diluida a una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM; la relación final de masas en la digestión es 0,001:1 tripsina:ectodominio de RSV F; la tripsina se usa a 10-15 unidades BAEE por mg de proteína) durante 1 hora a 37 °C.

Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos (por ejemplo, los polipéptidos que contienen sitios de escisión de furina alterados, y el polipéptido que contiene sitios de escisión de furina alterados y sitios de escisión de tripsina alterados) pueden contener además un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en el que, por ejemplo, están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-152, están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-154, están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-145 o están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-142. También se han descrito otras eliminaciones de péptido de fusión adecuadas, tales como la eliminación de los aminoácidos en las posiciones 137-146. Ruiz-Arguello y col., *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004).

En realizaciones particulares de la divulgación, el procedimiento incluye a) proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, tal como un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ectodominio de RSV F no escindido contiene sitios de escisión de furina alterados, los restos de lisina y arginina presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se eliminan o reemplazan con un aminoácido que no es lisina o arginina, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan por una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161; y b) purificar los monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido a partir del material biológico.

En ejemplos más particulares, el material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos incluye al menos un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en Furx, Furx R113Q K123N K124N, delp21 furx y delp23 furx.

En otras realizaciones particulares de la divulgación, el procedimiento incluye a) proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en el que el péptido de fusión está mutado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión está eliminada), tal como un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular; y b) purificar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos a partir del material biológico. El polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido puede contener sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F se secretan por una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 (incluyendo en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). Si se desea, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido con sitios de escisión de furina alterados contiene además sitios alterados o eliminados para otras proteasas (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 para evitar la escisión por proteasas (por ejemplo, tripsina). Por ejemplo, uno o más restos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los restos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se eliminan o reemplazan con un aminoácido que no es lisina o arginina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161.

Los monómeros, trímeros y combinaciones de monómeros y trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindidos pueden purificarse hasta el grado deseado. Generalmente se prefiere que se purifiquen los monómeros o trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindida, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por consiguiente, el procedimiento puede emplearse para producir fácilmente una composición que contiene monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptido de proteína RSV F escindidos que está sustancialmente libre de lípidos y lipoproteínas.

En un ejemplo, el procedimiento incluye proporcionar medio condicionado de cultivo de células de insecto, medio condicionado de cultivo de células de mamífero, medio condicionado de células de ave, medio condicionado de células de levadura, medio condicionado de células de *Tetrahymena*, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se purifican los trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. En otras

realizaciones, se purifican los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos. En otras realizaciones, se purifican los monómeros y trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos.

5 **Procedimientos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos con péptidos de fusión alterados**

En un aspecto, la divulgación es un procedimiento para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos que contienen un péptido de fusión alterado. Cuando se expresan en células hospedadoras polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F que no contienen sitios de escisión de furina alterados, las células hospedadoras procesan los polipéptidos, en parte escindiendo el polipéptido en los sitios de furina aproximadamente en las posiciones 109/110 y aproximadamente en las posiciones 136/137 para producir subunidades F₁ y F₂. Los polipéptidos procesados se secretan en el cultivo y pueden recuperarse como subunidades F₁-F₂ asociadas (por ejemplo, uniendo mediante disulfuro las subunidades F₁ y F₂), que pueden formar rosetas de trímeros mediante la agregación de péptidos de fusión expuestos. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F que contienen péptidos de fusión alterados pueden producirse en y secretarse por células hospedadoras en forma de subunidades F₁-F₂, y preferentemente no se agregan en rosetas o con lípidos o lipoproteínas contaminantes. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que los polipéptidos no forman rosetas o se asocian con lípidos y lipoproteínas contaminantes debido a que el péptido de fusión alterado no media la agregación.

El procedimiento de este aspecto de la divulgación incluye a) proporcionar un material biológico que contenga los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos que contienen un péptido de fusión alterado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión está eliminada), tal como un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular; y b) purificar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos a partir del material biológico. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos pueden purificarse en forma de trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos, o como una mezcla de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F adecuados que contienen péptidos de fusión alterados contienen sitios de escisión de furina escindibles aproximadamente en 109/110 y aproximadamente 136/137 y contienen además un péptido de fusión alterado tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse en el procedimiento un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F en el que están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-152, están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-153, están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-145, están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-146 o están eliminados aproximadamente los aminoácidos 137-142. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos incluye al menos la eliminación 1 de péptido de fusión.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos (por ejemplo, trímeros escindidos o una mezcla de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos) pueden purificarse hasta el grado deseado. Generalmente se prefiere que se purifiquen los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos que contienen un péptido de fusión alterado pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por consiguiente, puede usarse el procedimiento para producir fácilmente una composición que contenga trímeros, rosetas de trímeros o una combinación de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F escindido que esté sustancialmente libre de lípidos y lipoproteínas.

45 **Procedimientos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F con mutaciones de furina C-terminales**

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de RSV no escindidos en C-terminal y un procedimiento para preparar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal se escinden por células que producen las proteínas en el sitio de escisión de furina aproximadamente en la posición 109/110, pero no en el sitio de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137, y se secretan al medio en forma de una subunidad F₁ que se asocia con una subunidad F₂. Además se cree que el péptido de fusión hidrófobo no está expuesto en los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal y, por lo tanto, los polipéptidos no escindidos en C-terminal no se asocian con lípidos y lipoproteínas contaminantes. Tal como se describe además en el presente documento, los ectodominios de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden escindir-se adicionalmente para producir una subunidad F₁, en la que el extremo amino terminal es de la posición 110 a aproximadamente la posición 161, que se asocia con una subunidad F₂. Dichas subunidades F₁ y F₂, que pueden purificarse en forma de trímeros, rosetas de trímeros, o una mezcla de trímeros y rosetas de trímeros.

En general, la secuencia de aminoácidos de un ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal está alterado para prevenir la escisión en el sitio de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137, pero

contiene un sitio de escisión de proteasa de origen natural o introducir, que cuando se escinde produce una subunidad F_1 , en la que el extremo amino terminal es de la posición 110 a aproximadamente la posición 161, y una subunidad F_2 . Por ejemplo, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal puede tener una secuencia de aminoácidos que esté alterada para prevenir la escisión en los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137, pero contener uno o más sitios de escisión de proteasas de origen natural o introducidos entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161. En un ejemplo particular, la secuencia de aminoácidos de un ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal está alterado para prevenir la escisión en el sitio de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de furina de origen natural aproximadamente en la posición 109/110.

Pueden diseñarse fácilmente y preverse por un experto habitual en la materia una diversidad de secuencias de aminoácidos particulares que permitirán que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal se produzcan y expresen por células hospedadoras, incluyendo secuencias de aminoácidos que no se escinden en los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137. En general, se reemplazan o eliminan uno o más aminoácidos que forman parte de, o se localizan próximos a, los sitios de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137. Las sustituciones y eliminaciones de aminoácidos que previenen la escisión aproximadamente en la posición 136/137 se describen en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse la sustitución K131Q, la eliminación de los aminoácidos en las posiciones 131-134 o las sustituciones K131Q/R133Q/ R135Q/R136Q, cada una de las cuales inhibe la escisión en 136/137. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal comprenden al menos una sustitución o eliminación de aminoácidos aproximadamente en las posiciones 133-136.

De manera similar, son posibles y pueden diseñarse y preverse fácilmente una diversidad de secuencias de aminoácidos particulares de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal que contienen un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, de origen natural o introducido) que cuando se escinden producen una primera subunidad que comprende F_1 y una segunda subunidad que comprende F_2 . Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína RSV F entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 contiene sitios de escisión de tripsina, y uno o más de los sitios de escisión de tripsina pueden escindirse con tripsina para generar subunidades F_1 y F_2 . Si se desea, pueden introducirse uno o más sitios de reconocimiento de proteasas adecuados en el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal, por ejemplo, entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161. Los sitios de reconocimiento de proteasas pueden escindirse usando la proteasa adecuada para generar subunidades F_1 y F_2 . Cuando se introduce un sitio de reconocimiento de proteasa en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal, se prefiere que el sitio se reconozca por una proteasa que no escinda el ectodominio de la proteína RSV F de origen natural.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden producirse usando cualquier procedimiento adecuado. Un procedimiento preferido es mediante la expresión recombinante de construcciones que codifican un ectodominio de proteína RSV F en el que está alterada la secuencia del sitio de escisión de furina aproximadamente en las posiciones 136/137, de tal forma que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal se secretan por una célula hospedadora que produce los polipéptidos no escindidos en el sitio de escisión de furina aproximadamente en la posición 136/137. Preferentemente, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal se secreta por una célula hospedadora que lo produce en forma de una subunidad F_1 que se asocia con una subunidad F_2 , en el que el extremo amino terminal de la subunidad F_1 es de la posición 132 a aproximadamente la posición 161, pero no la posición 137. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden producirse usando cualquier célula hospedadora adecuada, tal como se describe en el presente documento.

Un procedimiento de este aspecto de la divulgación incluye: a) proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal que comprenden un sitio de escisión de furina alterado en la posición 136/137, y dichos polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal se secretan por una célula que los produce en forma de un fragmento F_2 que se asocia con una subunidad que comprende F_1 pero que no está escindida en la posición 136/137, y b) escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados con una proteasa que escinde el ectodominio de proteína RSV F en un sitio entre las posiciones 101 y 106, produciendo de este modo dicha composición. En realizaciones particulares, la etapa b) comprende escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal con una proteasa que escinde el ectodominio de proteína RSV F en un sitio entre aproximadamente las posiciones 101 y 132, o aproximadamente las posiciones 132 y 161, o aproximadamente las posiciones 110 y 132. Como alternativa o además, en algunas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal comprenden un sitio de escisión de furina alterado en la posición 136/137, con la salvedad que el sitio de escisión de furina alterado no sea una eliminación de los aminoácidos 131-134. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal incluye al menos el extremo polipéptido de furina N-terminal.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados pueden purificarse hasta un grado deseado. Por ejemplo, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados pueden proporcionarse en un lisado celular, homogenizado celular, o medio de cultivo

condicionado que está sustancialmente sin procesar (por ejemplo, sin procesar, o solo rebajado), o en forma parcial o sustancialmente purificada. En ejemplos particulares, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal se proporcionan en medio de condicionado de cultivo celular seleccionado entre el grupo que consiste en medio condicionado de células de insecto, medio condicionado de células de mamífero, medio condicionado de células de ave, medio condicionado de células de levadura, medio condicionado de células de *Tetrahymena*, y combinaciones de los mismos.

Generalmente se prefiere que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados estén purificados, por ejemplo, purificados hasta al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, mientras que las formas escindidas producidas de manera convencional de la proteína RSV F se purifican conjuntamente con lípidos y lipoproteínas contaminantes. Por consiguiente, cuando se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal purificados, puede usarse el procedimiento para producir fácilmente una composición que contenga ectodominios de proteína RSV F escindidos que esté sustancialmente libre de lípidos o fosfolípidos.

Los procedimientos adecuados para escindir polipéptidos usando una proteasa se conocen bien y son convencionales en la técnica. En general, los polipéptidos que van a escindir se combinan con una cantidad suficiente de proteasa en condiciones (por ejemplo, pH, concentración de polipéptido y proteasa, temperatura) adecuadas para la escisión del polipéptido. Hay disponibles comercialmente muchas proteasas adecuadas, y las condiciones adecuadas para llevar a cabo la escisión de polipéptidos se conocen bien para muchas proteasas. Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F pueden purificarse después de la escisión con proteasa.

En un ejemplo del procedimiento, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal que contienen un péptido de fusión intacto, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal en el que no se ha sustituido o eliminado ninguno de los aminoácidos entre las posiciones 137-154. En otro ejemplo del procedimiento, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal que contienen un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal en el que los aminoácidos aproximadamente 137-152, aproximadamente los aminoácidos 137-153, aproximadamente los aminoácidos 137-145 o aproximadamente los aminoácidos 137-142 están eliminados. También se han descrito otras eliminaciones de péptido de fusión adecuadas, tales como la eliminación de los aminoácidos en las posiciones 137-146. Ruiz-Arguello y col., *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004).

En algunas realizaciones, se purifican los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos se escinden, y la escisión da como resultado la formación de trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos. Si se desea, los trímeros pueden purificarse adicionalmente usando cualquier procedimiento adecuado, tal como cromatografía de exclusión por tamaño.

En ejemplos particulares del procedimiento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados contienen al menos el polipéptido de furina N-terminal (FIG. 1). Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal proporcionados se escinden, por ejemplo con tripsina, y la escisión da como resultado la formación de trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos, o una combinación de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F. Si se desea, los trímeros escindidos y/o rosetas de trímeros escindidos pueden purificarse adicionalmente usando cualquier procedimiento adecuado, tal como cromatografía de exclusión por tamaño.

Otro procedimiento de este aspecto de la divulgación incluye: a) proporcionar un material biológico, tal como un lisado celular, homogenizado celular o medio condicionado de cultivo celular, que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal que comprenden un sitio de escisión de furina alterado en la posición 136/137, y dichos polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F solubles se secretan por una célula que los produce en forma de un fragmento F_2 que se asocia con una subunidad que comprende F_1 pero que no está escindida en la posición 136/137, con la salvedad que el sitio de escisión de furina alterado no sea una eliminación de los aminoácidos 131-134; y b) purificar los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal a partir del material biológico, produciendo de este modo la composición. Preferentemente, el extremo amino terminal de la subunidad F_1 es desde aproximadamente la posición 110 a aproximadamente la posición 132. Más preferentemente, el extremo amino terminal de la subunidad F_1 está aproximadamente en la posición 110. Se prefiere particularmente que el extremo amino terminal de la subunidad F_1 no se encuentre en la posición 137. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal incluye al menos el extremo polipéptido de furina N-terminal.

Si se desea, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindido en C-terminal contiene además sitios alterados o eliminados para otras proteasas (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 para evitar la escisión por proteasas (por ejemplo, tripsina). Por ejemplo, uno o más restos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los restos de lisina y arginina) presentes entre

aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se eliminan o reemplazan con un aminoácido que no es lisina o arginina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161. Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden contener un péptido de fusión intacto o un péptido de fusión alterado, tal como se describe en el presente documento.

Los monómeros, trímeros y combinaciones de monómeros y trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden purificarse hasta el grado deseado. Generalmente se prefiere que se purifiquen los monómeros o trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por consiguiente, el procedimiento puede emplearse para producir fácilmente una composición que contiene polipéptidos de proteína RSV F no escindidos en C-terminal, por ejemplo, monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros que está sustancialmente libre de lípidos y lipoproteínas. En ejemplos particulares del procedimiento, los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal contienen al menos el polipéptido de furina N-terminal (FIG. 1).

En un ejemplo, el procedimiento incluye proporcionar medio condicionado de cultivo de células de insecto, medio condicionado de cultivo de células de mamífero, medio condicionado de células de ave, medio condicionado de células de levadura, medio condicionado de células de Tetrahymena o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se purifican los trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal. En otras realizaciones, se purifican los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal. En otras realizaciones, se purifican los monómeros y trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal.

ARN autorreplicante

Los polipéptidos de RSV F descritos en el presente documento pueden producirse mediante expresión de ácidos nucleicos recombinantes que codifican los polipéptidos en las células de un sujeto. Los ácidos nucleicos preferidos que pueden administrarse a un sujeto para provocar la producción de polipéptidos RSV F son moléculas de ARN autorreplicante. Las moléculas de ARSN autorreplicante se basan en el ARN genómico de virus de ARN, pero carecen de los genes que codifican una o más proteínas estructurales. Las moléculas de ARN autorreplicantes son capaces de traducirse para producir proteínas no estructurales del virus de ARN y proteínas heterólogas codificadas por el ARN autorreplicante.

El ARN autorreplicante contiene generalmente al menos uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en replicasa vírica, proteasas víricas, helicasas víricas y otras proteínas víricas no estructurales, y también comprende secuencias de replicación activas en cis en el extremo 5' y 3', y si se desea, secuencias heterólogas que codifican secuencias de aminoácidos deseadas (por ejemplo, una proteína, un antígeno). Puede incluirse un promotor subgenómico que dirija la expresión de la secuencia heteróloga en el ARN autorreplicante. Si se desea, la secuencia heteróloga puede fusionarse en fase a otras regiones codificantes en el ARN autorreplicante y/o puede estar bajo el control de un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES).

Las moléculas de ARN autorreplicante de la invención pueden diseñarse de tal modo que la molécula de ARN autorreplicante no puede inducir la producción de partículas víricas infecciosas. Esto puede lograrse, por ejemplo, omitiendo uno o más genes víricos que codifican proteínas estructurales que son necesarias para la producción de partículas víricas en el ARN autorreplicante. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN autorreplicante está basada en un alfa virus, tal como el virus Sinebis (SIN), el virus del bosque Semliki y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), pueden omitirse uno o más genes que codifican proteínas estructurales víricas, tales como las glucoproteínas de la cápsida y/o envuelta. Si se desea, las moléculas de ARN autorreplicantes de la invención pueden diseñarse para inducir la producción de partículas víricas infecciosas que sean atenuadas o virulentas, o para producir partículas víricas que son capaces de una sola ronda de infección posterior.

La molécula de ARN autorreplicante puede, cuando se administra a una célula de vertebrado incluso sin proteínas, dar lugar a la producción de múltiples ARN descendientes a partir de la transcripción de sí mismo (o formar una copia antisentido de sí mismo). El ARN autorreplicante puede traducirse directamente después de la administración a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que después produce transcritos a partir del ARN administrado. Por lo tanto, el ARN administrado da lugar a la producción de múltiples ARN descendientes. Estos transcritos son antisentido en relación al ARN administrado y pueden traducirse por sí mismos para proporcionar expresión *in situ* de un producto génico, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN administrado que se traducen para proporcionar expresión *in situ* del polipéptido RSV-F codificado.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es usar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de hebra + se traducen después de la administración a una célula para proporcionar una replicasa (o

replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de hebra genómica del ARN de hebra + administrado. Estos transcritos de hebra - pueden transcribirse por sí mismos para proporcionar copias adicionales del ARN progenitor de hebra + y también proporcionar un transcrito subgenómico que codifica el polipéptido de RSV F. La traducción del transcrito subgenómico da lugar por lo tanto a la expresión *in situ* del polipéptido de RSV-F por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus Sindbis, de un virus del bosque Semliki, de un virus de la encefalitis equina oriental, de un virus de la encefalitis equina venezolana, etc.

Una molécula de ARN autorreplicante preferida codifica por lo tanto (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN a partir de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un polipéptido de RSV F. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, que comprende la proteína nSP4 de alfavirus.

Mientras que los genomas de alfavirus codifican proteínas estructurales de virión además de la poliproteína replicasa no estructural, se prefiere que la molécula de ARN autorreplicante basada en alfavirus de la invención no codifique proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, el ARN autorreplicante puede dar lugar a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones de alfavirus que contengan ARN. La incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia del alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse por sí misma en su forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus de tipo silvestre están ausentes en los ARN autorreplicantes de la invención y se toma su lugar por genes que codifican el producto génico deseado, de tal forma que el transcrito subgenómico codifica el producto génico deseado en lugar de las proteínas estructurales del virión de alfavirus.

Por lo tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos fases abiertas de lectura. La primera fase abierta de lectura (5') codifica una replicasa; la segunda fase abierta de lectura (3') codifica un polipéptido de RSV F. En algunas realizaciones, el ARN puede tener fases abiertas de lectura adicionales (cadena abajo) por ejemplo, que codifican productos génicos deseados adicionales. Una molécula de ARN autorreplicante puede tener una secuencia 5' que es compatible con la replicasa codificada.

En un aspecto, la molécula de ARN autorreplicante procede de o está basada en un alfavirus. En otros aspectos, la molécula de ARN autorreplicante procede de o está basada en un virus distinto de un alfavirus, preferentemente, un virus de ARN de hebra positiva, y más preferentemente un picornavirus, flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepacivirus, calicivirus, o coronavirus. Las secuencias de alfavirus de tipo silvestre adecuadas se conocen bien y están disponibles a través de depósitos de secuencias, tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Md. Los ejemplos representativos de alfavirus adecuados incluyen Aura (ATCC VR-368), Bebaru virus (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), virus de la encefalomiélitis equina oriental (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylygach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), virus Ross River (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), encefalomiélitis equina venezolana (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalomiélitis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), e Y-62-33 (ATCC VR-375).

El ARN autorreplicante puede asociarse con un sistema de administración. El ARN autorreplicante puede administrarse con o sin un adyuvante.

SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE ARN

Los ARN autorreplicantes de la divulgación son adecuados para su administración en una diversidad de modalidades, tal como administración de ARN desnudo o en combinación con lípidos, polímeros u otros compuestos que facilitan la entrada en las células. Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden introducirse en células o sujetos diana usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, mediante inyección directa, microinyección, electroporación, lipofección, biolística, y similares. La molécula de ARN autorreplicante también puede introducirse en células mediante endocitosis mediada por receptor. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.090.619; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 263:14621 (1988); y Curiel y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850 (1991). Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.083.741 divulga la introducción de un ácido nucleico exógeno en células de mamífero asociando el ácido nucleico a un resto policatiónico (por ejemplo, poli-L-lisina que tiene 3-100 restos de lisina), que a su vez está acoplado a un resto de unión a receptor de integrina (por ejemplo, un péptido cíclico que tiene la secuencia Arg-Gly-Asp).

La molécula de ARN autorreplicante de la presente invención puede administrarse a células mediante anfilos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.071.890. Normalmente, una molécula de ácido nucleico puede formar un complejo con el anfilo catiónico. Las células de mamífero puestas en contacto con el complejo pueden captarlo fácilmente.

El ARN autorreplicante puede administrarse en forma de ARN desnudo (por ejemplo, únicamente como una solución acuosa de ARN) pero, para potenciar la entrada a las células y también los efectos intercelulares posteriores, el ARN autorreplicante se administra preferentemente en combinación con un sistema de administración, tal como un sistema de administración en partículas o en emulsión. Los expertos en la materia conocen un gran número de sistemas de administración. Dichos sistemas de administración incluyen, por ejemplo, administración basada en liposomas (Debs y Zhu (1993) documento WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7): 682-691; Rose, Patente de Estados Unidos n.º 5.279.833; Brigham (1991) documento WO 91/06309; y Felgner y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7414), así como el uso de vectores víricos (por ejemplo, adenovirales (véase, *por ejemplo*, Berns y col. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772: 95-104; Ali y col. (1994) *Gene Ther.* 1: 367-384; y Haddada y col. (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (Pt 3): 297-306 para una revisión), papilomavirales, retrovirales (véase, *por ejemplo*, Buchscher y col. (1992) *J. Virol.* 66(5) 2731-2739; Johann y col. (1992) *J. Virol.* 66(5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt y col., (1990) *Virol.* 176:58-59; Wilson y col. (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller y col., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal y col., documento PCT/US94/05700, y Rosenberg y Fauci (1993) en *Fundamental Immunology*, Tercera edición, Paul (ed) Raven Press, Ltd., Nueva York, y las referencias en el mismo, y Yu y col., *Gene Therapy* (1994) anteriormente citado.), y vectores víricos adenoasociados (véase, West y col. (1987) *Virology* 160:38-47; Carter y col. (1989) Patente de Estados Unidos n.º 4.797.368; Carter y col. documento WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351 y Samulski (anteriormente) para una revisión de los vectores AAV; véase también, Lebkowski, la Patente de Estados Unidos n.º 5.173.414; Tratschin y col. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260; Tratschin, y col., (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081; Hermonat y Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470; McLaughlin y col. (1988) y Samulski y col. (1989) *J. Virol.*, 63:03822-3828), y similares.

Tres sistemas de administración particularmente útiles son (i) liposomas (ii) micropartículas poliméricas no tóxicas y biodegradables (iii) emulsiones de aceite en agua submicrométricas catiónicas.

Liposomas

Diversos lípidos anfífilos pueden formar bicapas en ambiente acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN en forma de un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo de cabeza aniónico, catiónico o zwitteriónico. La formación de liposomas a partir de fosfolípidos aniónicos se remonta a la década de 1960, y los lípidos formadores de liposomas catiónicos se han estudiado desde la década de 1990. Algunos fosfolípidos son aniónicos mientras que otros son zwitteriónicos. Las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, y fosfatidilgliceroles, y se listan en la tabla 20 algunos fosfolípidos útiles. Los lípidos catiónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, dioleoil trimetilamonio propano (DOTAP), 1,2-disteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwitteriónicos incluyen, pero sin limitación, lípidos zwitteriónicos de acilo y lípidos zwitteriónicos de éter. Los ejemplos de lípidos zwitteriónicos útiles son DPPC, DOPC y dodecilsfosfolina. Los lípidos pueden ser saturados o insaturados.

Los liposomas pueden formarse a partir de un solo lípido o a partir de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwitteriónicos (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwitteriónicos (vi) una mezcla de lípidos zwitteriónicos y lípidos catiónicos o (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwitteriónicos. De igual forma, una mezcla puede comprender lípidos tanto saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwitteriónico, saturado), DLinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMPG (aniónico, saturado). En los casos donde se usa una mezcla de lípidos, no todos los lípidos componentes de la mezcla necesitan ser anfífilos, por ejemplo, pueden mezclarse uno o más lípidos anfífilos con colesterol.

La parte hidrófila de un lípido puede PEGilarse (es decir, modificarse mediante la unión covalente de un polietilenglicol). Esta modificación puede aumentar la estabilidad y prevenir la adsorción ni específica de los liposomas. Por ejemplo, los lípidos pueden conjugarse a PEG usando técnicas tales como aquellas desveladas en Heyes y col. (2005) *J Controlled Release* 107:276-287.

En los ejemplos se usa una mezcla de DSPC, DLinDMA, PEG-DMPG y colesterol. Un aspecto separado es un liposoma que comprende DSPC, DLinDMA, PEG-DMG y colesterol. Este liposoma encapsula preferentemente ARN, tal como un ARN autorreplicante, por ejemplo, que codifica un inmunógeno.

Los liposomas se dividen normalmente en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y las LUV tienen una sola bicapa que encapsula a un núcleo acuoso; Las SUV tienen típicamente un diámetro < 50 nm, y las LUV tienen un diámetro > 50 nm. Los liposomas útiles son idealmente LUV con un diámetro en el intervalo de 50-220 nm. Para una composición que comprende una población de LUV con diferentes diámetros: (i) al menos el 80 % en número deben tener diámetros en el intervalo de 20-220 nm, (ii) el diámetro medio (Z_{av} , según la intensidad) de la población está de manera ideal en el intervalo de 40-200 nm, y/o (iii) los diámetros deben tener un índice de polidispersión < 0,2.

Las técnicas para preparar liposomas adecuados se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véase Liposomes: Methods and Protocols, Volumen 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; Liposome Technology, volúmenes I, II y III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006; y Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady y Guyot). Citus Books, 2002. Un procedimiento útil implica mezclar (i) una solución etanólica de los lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii) tampón, seguido de mezclado, equilibrado, dilución y purificación (Heyes y col. (2005) J Controlled Release 107:276-87.). El ARN se encapsula preferentemente dentro de los liposomas, y por lo tanto el liposoma forma una capa externa alrededor de un núcleo acuoso que contiene ARN. Se ha descubierto que esta encapsulación protege al ARN de la digestión por RNasa. Los liposomas pueden incluir cierta cantidad de ARN externo (por ejemplo, en la superficie de los liposomas), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente su totalidad) se encuentra encapsulado.

Micropartículas poliméricas

Diversos polímeros pueden formar micropartículas para encapsular o adsorber ARN. El uso de un polímero sustancialmente no tóxico significa que el receptor puede recibir de manera segura las partículas, y el uso de un polímero biodegradable significa que las partículas pueden metabolizarse después de la administración para evitar una persistencia a largo plazo. Los polímeros útiles también pueden esterilizarse, para ayudar en la preparación de formulaciones de grado farmacéutico.

Los polímeros biodegradables no tóxicos adecuados incluyen, pero sin limitación, poli(α -hidroxi ácidos), ácidos polihidroxi butíricos, polilactonas (incluyendo policaprolactonas), polidioxanonas, polivalerolactona, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, policarbonatos derivados de tirosina, polivinilpirrolidonas o poliesteramidas, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las micropartículas se forman a partir de poli(α -hidroxi ácidos), tales como poli(lactidas) ("PLA"), copolímeros de lactida y glicólido, tales como un poli(D,L-lactida-co-glicólido) ("PLG"), y copolímeros de D,L-lactida y caprolactona. Los polímeros PLG útiles incluyen aquellos que tienen una relación molar de lactida/glicólido en el intervalo, por ejemplo, de 20:80 a 80:20, por ejemplo, 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25. Los polímeros PLG útiles incluyen aquellos que tienen un peso molecular entre, por ejemplo, 5.000-200.000 Da, por ejemplo, entre 10.000-100.000, 20.000-70.000, 40.000-50.000 Da.

De manera ideal, las micropartículas tienen un diámetro en el intervalo de 0,02 μ m a 8 μ m. Para una composición que comprende una población de micropartículas con diferentes diámetros, al menos el 80 % en número debería tener diámetros en el intervalo de 0,03-7 μ m.

Las técnicas adecuadas para preparar micropartículas se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véase Functional Polymer Colloids and Microparticles volumen 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady y Guyot). Citus Books, 2002; Polymers in Drug Delivery, (eds. Uchegbu y Schatzlein). CRC Press, 2006. (en particular el capítulo 7) y Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen y Bernstein). CRC Press, 1996. Para facilitar la adsorción de ARN, una micropartícula puede incluir un tensioactivo y/o lípido catiónico, por ejemplo, tal como se desvela en O'Hagan y col. (2001) J Virology 75:9037-9043; y Singh y col. (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251. Un modo alternativo de preparar micropartículas poliméricas es mediante moldeado y curación, por ejemplo, tal como se desvela en el documento WO 2009/132206.

Las micropartículas pueden tener un potencial zeta de entre 40-100 mV.

El ARN puede adsorberse en las micropartículas, y la adsorción está facilitada mediante la inclusión de materiales catiónicos (por ejemplo, líquidos catiónicos) en la micropartícula.

Emulsiones catiónicas de aceite en agua

Las emulsiones de aceite en agua se conocen como adyuvantes en las vacunas de la gripe, por ejemplo, el adyuvante MF59™ en el producto FLUAD™, y el adyuvante AS03 en el producto PREPANDRIX™. La administración de ARN puede utilizar una emulsión de agua en aceite, siempre que la emulsión incluya una o más moléculas catiónicas. Por ejemplo, puede incluirse un lípido catiónico en la emulsión para proporcionar una superficie de gota positiva a la que puede unirse el ARN cargado negativamente.

La emulsión comprende uno o más aceites. Los aceites adecuados incluyen aquellos de, por ejemplo, un animal (tal como un pez) o una fuente vegetal. El aceite es de manera ideal biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y el aceite de oliva, que son los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Puede usarse aceite de jojoba obtenido, por ejemplo, de la alubia de la jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos, tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, tritical y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no aparecen naturalmente en los aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados partiendo de los aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de la

leche de mamíferos son metabolizables y por lo tanto pueden usarse. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica.

5 La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, el aceite de hígado de tiburón, y el aceite de ballena, tal como el esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de peces que pueden usarse en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos, y se citan generalmente como terpenoides. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también puede usarse. Los aceites de pescado, incluyendo escualano y escualeno, están fácilmente disponibles a través de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

10 Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. En los casos donde la fase oleosa de una emulsión incluya un tocoferol, puede usarse cualquiera de los α , β , γ , δ , ϵ o ζ tocoferoles, pero se prefieren los α -tocóferoles. Pueden usarse tanto D- α -tocóferol como DL- α -tocóferol. Un α -tocóferol preferido es DL- α -tocóferol. Puede usarse una combinación de aceites que comprenda escualeno y un tocoferol (por ejemplo, DL- α -tocóferol).

15 Las emulsiones preferidas comprenden escualeno, un aceite de hígado de tiburón que está ramificado, terpenoide insaturado ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C=CHCH_2CH_2C(CH_3)_2=CHCH_2]_2$; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; n.º CAS 7683-64-9).

20 El aceite en la emulsión puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, escualeno y al menos un aceite adicional.

El componente acuoso de la emulsión puede ser solo agua (por ejemplo, agua para inyección) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un tampón, por ejemplo, sales de fosfato o citrato, tales como sales de sodio. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón de histidina; o un tampón citrato. Se prefiere una fase acuosa tamponada, y los tampones se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.

25 La emulsión también incluye un lípido catiónico. Preferentemente, este lípido es un tensioactivo, de tal forma que puede facilitar la formación y estabilización de la emulsión. Los lípidos catiónicos útiles contienen generalmente un átomo de nitrógeno que está positivamente cargado en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en forma de una amina terciaria o cuaternaria. Este nitrógeno puede encontrarse en el grupo de cabeza hidrófilo de un tensioactivo anfílico. Los lípidos catiónicos adecuados incluyen, pero sin limitación: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC colesterol), dimetildioctadecilamonio (DDA, por ejemplo, el bromuro), 1,2-dimiristoil-3-trimetil-amoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetil amonio propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio propano (DSTAP). Otros lípidos catiónicos útiles son: cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetramida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de deciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), N,N',N'-polioxietileno (10)-N-sebo-1,3 -diaminopropano, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro mixto de alquil-trimetilamonio, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), cloruro de metilbencetonio, cloruro de decametonio, cloruro de metiltrialquil amonio mixto, cloruro de metiltrioctilamonio), cloruro de N,N-dimetil-N-[2 (2-metil-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)- fenoxil-etoxi)etil]-bencenometanamino (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio) propano (grupo acilo = dimiristoilo, dipalmitoilo, diestearoilo, dioleoil), 1,2-diacil-3 (dimetilamonio)propano (grupo acilo = dimiristoilo, dipalmitoilo, diestearoilo, dioleoil), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanoil-*sn*-glicerol, colin éster de 1,2-dioleoil 3-succinil-*sn*-glicerol, (4'-trimetilamonio)butanoato) de colesterilo, sales de N-alkil piridinio (por ejemplo, bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alkilpiperidinio, electrolitos bolaform dicatiónicos (C12Me6; C12BU6), dialquiliglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L- α -dioleoilfosfatidiletanolamina, colin éster de hemisuccinato de colesterol, lipopoliaminas, incluyendo, pero sin limitación, dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS), dipalmitoil fosfatidiletanolamidoespermina (DPPEs), lipopoli-L (o D)-lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada a N-gluratilfosfatidiletanolamina, éster de glutamato de didodecilo con grupo amino colgante (C[^]GluPhCnN), éster de glutamato de ditradecilo con grupo amino colgante (C14GluCnN+), derivados catiónicos de colesterol, incluyendo, pero sin limitación, sal de colesteril-3 β -oxisuccinamidoetiltrimetilamonio, colesteril-3 β -oxisuccinamidoetilendimetilamina, sal de colesteril-3 β -carboxiamidoetiltrimetilamonio, y colesteril-3 β -carboxiamidoetilendimetilamina. Otros lípidos catiónicos útiles se describen en los documentos US 2008/0085870 y US 2008/0057080, que se incorporan al presente documento por referencia.

El lípido catiónico es preferentemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

Además del aceite y del lípido catiónico, una emulsión puede incluir un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo zwitteriónico. Dichos tensioactivos incluyen, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (normalmente citados como Tween), especialmente el polisorbato 20 y el polisorbato 80; copolímeros de óxido de

5 etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializado con el nombre comercial DOWFAX™, tal como copolímero de bloque de EO/PO lineal; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi(oxi-1,2-etanodilo) repetitivos, siendo particularmente interesante el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octofenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como monolauriléter de trietilenglicol (Brij 30); éter de polioxietileno-9-laurilo; y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los Span), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferidos para incluirlos en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

10 Pueden incluirse en la emulsión mezclas de estos tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton X-100. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol, tal como t-octilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauril éter 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol. Las mezclas adecuadas pueden comprender un tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo, polisorbato 80, con un HLB de 15,0) y un tensioactivo con un valor de HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo, trioleato de sorbitán, con un HLB de 1,8).

Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final son de entre el 2-20 %, por ejemplo, del 5-15 %, 6-14 %, 7-13 %, 8-12 %. Es particularmente útil un contenido de escualeno de aproximadamente el 4-6 % o de aproximadamente el 9-11 %.

20 Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) en la emulsión final son de entre el 0,001 % y el 8 %. Por ejemplo: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como polisorbato 80) del 0,2 al 4 %, en particular entre el 0,4--0,6 %, entre el 0,45-0,55 %, aproximadamente del 0,5 % o entre el 1,5-2 %, entre el 1,8-2,2 %, entre el 1,9-2,1 %, aproximadamente 2 %, o 0,85-0,95 %, o aproximadamente 1 %; ésteres de sorbitán (tales como trioleato de sorbitán) del 0,02 al 2 %, en particular aproximadamente el 0,5 % o aproximadamente el 1 %; octil o nonilfenoxi polietanoles (tales como Triton X-100) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como lauril éter 9) del 0,1 al 8 %, preferentemente del 0,1 al 10 % y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente el 0,5 %.

Las cantidades absolutas de aceite y tensioactivo, y sus proporciones, pueden variarse dentro de límites amplios mientras que sigan formando una emulsión. Un experto en la materia puede variar fácilmente las proporciones relativas de los componentes para obtener una emulsión deseada, pero es típica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para aceite y surfactante (exceso de aceite).

Un parámetro importante para asegurar la actividad inmunoestimuladora de una emulsión, particularmente en animales grandes, es el tamaño de la gota de aceite (diámetro). Las emulsiones más eficaces tienen un tamaño de gota en la escala submicrométrica. De manera adecuada, los tamaños de las gotas se encontrarán dentro del intervalo de 50-750 nm. De manera más útil, el tamaño medio de la gota es de menos de 250 nm, por ejemplo, de menos de 200 nm, menos de 150 nm. El tamaño medio de la gota se encuentra de manera útil dentro del intervalo de 80-180 nm. De manera ideal, al menos el 80 % (en número) de las gotas de aceite de la emulsión tienen un diámetro menor de 250 nm, y preferentemente al menos el 90 %. Los aparatos para determinar el tamaño medio de la gota en una emulsión, y la distribución de tamaño, están disponibles comercialmente. Estos usan típicamente las técnicas de dispersión dinámica de luz y/o de sensor óptico de una sola partícula, por ejemplo, las series de instrumentos Accusizer™ y Nicom™ disponibles de Particle Sizing Systems (Santa Barbara, EE.UU.), o los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (R.U.), o el instrumento analizador de distribución de tamaño de partícula de Horiba (Kioto, Japón).

De manera ideal, la distribución de los tamaños de gota (en número) tiene solo un máximo, es decir, hay una sola población de gotas distribuidas alrededor de una media (moda), en lugar de tener dos máximos. Las emulsiones preferidas tienen una polidispersidad de < 0,4, por ejemplo, 0,3, 0,2, o menor.

Las emulsiones adecuadas con gotas submicrométricas y una distribución por tamaños estrecha pueden obtenerse mediante el uso de microfluidificación. Esta técnica reduce el tamaño medio de la gota de aceite mediante corrientes impulsoras de componentes de entrada a través de canales geoméricamente fijos a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes entran en contacto con las paredes del canal, paredes de la cámara y entre sí. Las fuerzas de cizalla, impacto y cavitación provocan la reducción del tamaño de la gota. Pueden llevarse a cabo etapas repetidas de microfluidificación hasta que se obtenga una emulsión con un tamaño medio y distribución de gota deseada.

Como alternativa a la microfluidificación, pueden usarse procedimientos térmicos para provocar la inversión de fase. Estos procedimientos también pueden proporcionar una emulsión submicrométrica con una distribución de tamaño de partícula compacta.

Las emulsiones preferidas pueden esterilizarse por filtración, es decir, sus gotas pueden pasar a través de un filtro de 220 nm. Además de proporcionar esterilización, este procedimiento también elimina cualquier gota grande en la emulsión.

aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 0,8 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 0,9 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 1,2 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 1,45 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 2 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 2,5 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 3 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 3,5 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 4 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, desde aproximadamente 4,5 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 1,2 mg/ml, aproximadamente 1,45 mg/ml, etc. Como alternativa, la emulsión de aceite en agua puede comprender DDA a aproximadamente a 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 21,5 mg/ml, aproximadamente 21,6 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml. En una realización ejemplar, la emulsión catiónica de aceite en agua comprende desde aproximadamente 0,73 mg/ml a aproximadamente 1,45 mg/ml de DDA, tal como 1,45 mg/ml.

Pueden usarse catéteres o dispositivos similares para administrar las moléculas de ARN autorreplicantes, en forma de ARN desnudo o en combinación con un sistema de administración, en un órgano o tejido diana. Los catéteres adecuados se desvelan en, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos n.º 4.186.745; 5.397.307; 5.547.472; 5.674.192 y 6.129.705.

La presente invención incluye el uso de sistemas de administración adecuados, tales como liposomas, micropartículas poliméricas o micropartículas en emulsión submicrométrica con ARN autorreplicante encapsulado o adsorbido, para administrar una molécula de ARN autorreplicante que codifica un polipéptido de RSV-F, por ejemplo, para suscitar solo una respuesta inmunitaria, o en combinación con otra macromolécula. La invención incluye liposomas, micropartículas y emulsiones submicrométricas con moléculas de ARN autorreplicante adsorbidas y/o encapsuladas, y combinaciones de las mismas.

Tal como se demuestra adicionalmente en los ejemplos, las moléculas de ARN autorreplicantes asociadas con liposomas y micropartículas en emulsión submicrométricas pueden administrarse de manera eficaz a la célula hospedadora, y pueden inducir una respuesta inmunitaria hacia la proteína codificada por el ARN autorreplicante.

La composición inmunogénica

La invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos de la reivindicación 1. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir un solo agente inmunogénico activo, o varios agentes inmunogénicos. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede comprender polipéptidos de RSV F que estén en una forma individual (por ejemplo, monómero, trímero, o rosetas) o en dos o más formas (por ejemplo, una mezcla de monómero y trímero en un equilibrio dinámico entre monómero y trímero). La composición inmunogénica puede comprender un ARN autorreplicante que codifica un polipéptido de RSV F, y preferentemente comprende también un sistema de administración adecuado, tales como liposomas, micropartículas poliméricas, una emulsión de aceite en agua y combinaciones de los mismos.

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, desvelados adicionalmente más adelante.

En otra realización, una composición inmunogénica de la invención comprende un polipéptido que muestra un epítipo presente en la conformación pre-fusión o una intermedia de la glucoproteína RSV-F, pero no muestra la conformación post-fusión de la glucoproteína.

En otra realización, una composición inmunogénica de la invención comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en la que el primer polipéptido comprende una proteína RSV F, en su totalidad o en parte, y el segundo polipéptido comprende un dominio de oligomerización heterólogo. El primer polipéptido puede comprender un ectodominio de proteína RSV F. El segundo polipéptido puede ser un dominio de trimerización de hemaglutinina de la gripe, un dominio de trimerización de spike de SARS, un dominio de trimerización de gp41, NadA, GCN4 modificada o ATCasa de VIH.

En un aspecto, la invención es una composición que comprende polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos producidos proporcionando polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, o polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal, y escindirlos para producir subunidades F₁ y F₂, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende trímeros y/o monómeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindidos producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, y purificando los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, trímeros no escindidos, o una combinación de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos (por ejemplo, una mezcla o un equilibrio dinámico) a partir del material biológico, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F contiene sitios de escisión de furina alterados aproximadamente en las posiciones 106-109 y

aproximadamente en las posiciones 133-136, y si se desea pueden contener además un péptido de fusión alterado. En otras realizaciones, el ectodominio de proteína RSV F contiene sitios de escisión de furina alterados aproximadamente en las posiciones 106-109 y aproximadamente en las posiciones 133-136, y sitios de escisión de tripsina alterados entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y si se desea pueden contener además un péptido de fusión alterado.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende trímeros y/o monómeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos en C-terminal, y purificando los monómeros de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos, trímeros no escindidos, o una combinación de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos (por ejemplo, una mezcla o un equilibrio dinámico) a partir del material biológico, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F escindidos que contienen un péptido de fusión alterado (por ejemplo, se elimina al menos una porción del péptido de fusión) y purificando los trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F escindidos a partir del material biológico, tal como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F no escindidos que contienen un péptido de fusión alterado (por ejemplo, se elimina al menos una porción del péptido de fusión) y purificando los monómeros de polipéptido de ectodominio de proteína RSV F no escindidos a partir del material biológico, tal como se describe en el presente documento.

Las composiciones de la invención son preferentemente adecuadas para su administración a un sujeto mamífero, tal como un ser humano, e incluyen uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo adyuvantes. Una discusión exhaustiva de dichos componentes se encuentra disponible en la referencia 29. Las composiciones se encontrarán generalmente en forma acuosa. Cuando la composición es una composición inmunogénica, suscitará una respuesta inmunitaria cuando se administra a un mamífero, tal como un ser humano. La composición inmunogénica puede usarse para preparar una formulación de vacuna para inmunizar a un mamífero.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir un solo agente inmunogénico activo, o varios agentes inmunogénicos. Por ejemplo, el polipéptido de ectodominio de proteína RSV F puede estar en una sola forma (por ejemplo, monómero no escindido, monómero escindido, trímero no escindido, trímero escindido, o rosetas de trímeros escindidos) o en dos o más formas (por ejemplo, una mezcla de monómero no escindido y trímero no escindido o un equilibrio dinámico entre monómero no escindido y trímero no escindido). Además, las composiciones pueden contener un polipéptido de ectodominio de proteína RSV F y otras una o más proteínas de RSV (por ejemplo, una proteína G y/o una proteína M) y/o puede combinarse con inmunógenos de otros patógenos.

Las composiciones pueden incluir conservantes, tales como timerosal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurio, *por ejemplo*, libre de timerosal. Se prefieren especialmente las composiciones inmunogénicas que no contienen mercurio. Se prefieren particularmente las composiciones inmunogénicas libres de conservantes.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato potásico, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y similares.

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y generalmente se encontrarán dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM. El pH de una composición será generalmente de entre 5,0 y 8,1, y más típicamente entre 6,0 y 8,0, *por ejemplo*, entre 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Un procedimiento de la invención puede incluir por lo tanto una etapa de ajuste del pH de la vacuna en bruto antes de su envasado.

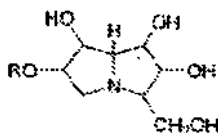
La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirogénica, *por ejemplo*, que contiene < 1 QUE (unidades de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente < 0,1 QUE por dosis. La composición es preferentemente sin gluten. Las vacunas humanas se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5ml, aunque puede administrarse media dosis (es decir, aproximadamente 0,25ml) a niños.

Adyuvantes

Las composiciones de la invención, que contienen polipéptidos de RSV F, o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de RSV F, también pueden incluir uno o más adyuvantes, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más adyuvantes, que pueden funcionar para potenciar las respuestas inmunitarias (humorales y/o celulares) suscitadas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación:

- 5 • Composiciones que contienen minerales. Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas). La invención incluye sales minerales, tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, *etc.*, o mezclas de diferentes compuestos minerales, adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, *etc.*), y prefiriéndose la adsorción. Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la ref. 38). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, y similares. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse en forma de una partícula de una sal metálica (39). Los adyuvantes de sales de aluminio se describen en más detalle más adelante.
- 10 • Composiciones de emulsión de aceite (véase en más detalle a continuación). Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno en agua, tales como MF59 (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span al 0,5 %, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificante).
- 20 • Agentes inductores de citocinas (véase en más detalle más adelante). Los agentes inductores de citocinas adecuados para su uso en la invención incluyen agonistas del receptor 7 similar a toll (TLR7) (por ejemplo, compuestos de benzonafitridina desvelados en el documento WO 2009/111337).
- 25 • Saponinas (capítulo 22 de la ref. 74), que son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una gran variedad de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol de Molina *Quillaia saponaria* se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilaxornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officianalis* (jabonera). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como STIMULON (TM). Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Se desvela un procedimiento para la producción de QS21 en la ref. 40. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol (41). Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM) (capítulo 23 de la ref. 74). Los ISCOM también incluyen típicamente un fosfolípido, tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM se puede usar cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las ref. 41-43. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional (44). Puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en las ref. 45 y 46.
- 30 • Adyuvantes grasos (véase en más detalle más adelante), incluyendo emulsiones de aceite en agua, lípidos naturales modificados procedentes de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos de fosfolípidos (tales como el dímero de fosfolípido sintético, E6020) y similares.
- 35 • Toxinas ribosilantes de ADP bacteriano, por ejemplo, la enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT", toxina del cólera "CT", o toxina de pertussis "PT" y derivados detoxificados de las mismas, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 (47). El uso de toxinas ribosilantes de ADP destoxificadas como adyuvantes mucosales se describe en la ref. 48 y como adyuvantes parenterales en la ref. 49.
- 40 • Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado (50) o quitosano y sus derivados (51).
- 45 • Micropartículas (es decir, una partícula de -100 nm a -150 µm de diámetro, más preferentemente de -200 nm a -30 µm de diámetro, o de -500 nm a -10 µm de diámetro) formada de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxi ácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, y similares), prefiriéndose la poli(lactida-co-glicólido), opcionalmente tratadas para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).
- 50 • Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 74). Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las ref. 52-54.
- 55

- Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (55). Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (56) así como tensioactivos de éteres o éster de polioxietileno alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como octoxinol (57). Los éteres de polioxietileno se seleccionan entre el siguiente grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo (lauril éter 9), éter de polioxietileno-9-esteroilo, éter de polioxietileno-8-esteroilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo, y éter de polioxietileno-23-laurilo.
- Péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida ("DTP-DPP", o "Theramide™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2' dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina ("MTP-PE").
- Una preparación de proteasoma de proteína de la membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram negativa en combinación con una preparación de lipopolisacárido procedente de una segunda bacteria Gram-negativa, en la que el proteasoma de proteína de la membrana externa y las preparaciones de lipopolisacárido forman un complejo adyuvante estable no covalente. Dichos complejos incluyen "IVX-908", un complejo compuesto de membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos.
- Un polímero de polioxidonio (58, 59) u otro derivado de polietileno-piperazina N-oxidado.
- 5'-monofosfato de metil inosina ("MIMP") (60).
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxiado (61), tal como uno que tenga la fórmula:



- donde R se selecciona entre el grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo lineales o ramificados, sustituidos o sin sustituir, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, y similares.
- Un ligando de CD1d, tal como una α -glucosilceramida (62-69) (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glucosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101,3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.
 - Una gamma inulina (70) o derivado de la misma, tal como algamulina.
 - Virosonas y partículas similares a virus (VLP). Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus combinadas o formuladas opcionalmente con un fosfolípido. Generalmente no son patógenas, no se replican y generalmente no contienen nada del genoma vírico nativo. Las proteínas víricas pueden producirse de manera recombinante o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para su uso en los virosomas o VLP incluyen proteínas procedentes del virus de la gripe (tales como HA y NA), del virus de la hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o la cápsida), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la enfermedad del pie y la boca, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tales como proteínas de envuelta), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (tal como proteína p1 de Ty de retrotransposición).

Estas y otras sustancias activas como adyuvantes se discuten en más detalle en las referencias 74 y 75.

Las composiciones pueden incluir dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden incluir de manera ventajosa tanto una emulsión de aceite en agua como un agente inductor de citocinas, o tanto una composición que contiene minerales como un agente inductor de citocinas, o dos adyuvantes de emulsión de aceite en agua, o dos compuestos de benzonaftiridina, etc.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán típicamente en una mezcla.

Adyuvantes de emulsión de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno en agua, tales como MF59 (escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 %, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidificante). También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Se conocen varias emulsiones de aceite en agua, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite (o aceites) y el tensioactivo (o tensioactivos) biodegradable(s) (metabolizables) y biocompatible(s). Las gotas de aceite en la emulsión tienen generalmente un diámetro menor de 5 µm, y pueden tener incluso un diámetro submicrométrico, lográndose estos pequeños tamaños con un microfluidificador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño menor de 220 nm ya que pueden someterse a esterilización por filtrado.

La invención puede usarse con aceites, tales como aquellas de un animal (tal como un pez) o una fuente vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y el aceite de oliva, que son los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nueces. Puede usarse aceite de jojoba, *por ejemplo*, obtenida de la alubia de la jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos, tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticual y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no aparecen naturalmente en los aceites de semillas, pueden prepararse mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados partiendo de los aceites de nueces y semillas. Las grasas y aceites de leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, el aceite de hígado de tiburón, y el aceite de ballena, tal como el esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de peces que pueden usarse en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos, y se citan generalmente como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado insaturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que se prefiere particularmente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, es también un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualano y escualeno, están fácilmente disponibles a través de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse según su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos de la invención preferidos tienen un HLB de al menos 10, preferentemente de al menos 15, y más preferentemente de al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos incluyendo, pero sin limitación: los tensioactivos de ésteres de polioxietileno sorbitán (normalmente citados como Tween), especialmente el polisorbato 20 y el polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), comercializados con el nombre comercial DOWFAX (TM), tal como copolímero de bloque de EO/PO lineal; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi(oxi-1,2-etanodiol) repetitivos, siendo particularmente interesante el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octofenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie NP de TERGITOL (TM); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como monolauriléter de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluirlos en la emulsión son TWEEN 80 (TM) (monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de TWEEN 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN 80 (TM)) y un octoxinol, tal como t-octilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauril éter 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (en % en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tal como TWEEN 80 (TM)) del 0,01 al 1 %, en particular aproximadamente del 0,1 %; octil o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como lauril éter 9) del 0,1 al 20 %, preferentemente del 0,1 al 10 % y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente el 0,5 %.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles en la invención incluyen, pero sin limitación:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, TWEEN 80 (TM), y Span 85. La composición de la emulsión, en volumen, puede ser de aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En cuanto al peso, estas proporciones se convierten en un 4,3 % de escualeno, un 0,5 % de polisorbato 80 y un 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como "MF59" (71-73), tal como se describe en más detalle en el capítulo 10 de la ref. 74 y en el capítulo 12 de la ref. 75. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, *por ejemplo*, tampón de citrato de sodio 10 mM.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y TWEEN 80 (TM). La emulsión puede incluir suero salino tamponado con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de TWEEN 80 (TM), y la relación en peso de

escualeno:tocoferol es preferentemente < 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y TWEEN 80 (TM) pueden estar presentes a una relación de volumen de aproximadamente 5:2. Una de dichas emulsiones puede elaborarse disolviendo TWEEN 80 (TM) en PBS para proporcionar una solución al 2 %, después mezclando 90ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite submicrométricas, *por ejemplo*, con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes respecto de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxamer 401 ("PLURONIC (TM) L121"). La emulsión puede formularse en suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (76) (Thr-MDP al 0,05-1 %, escualano al 5 %, Pluronic L121 al 2,5 % y polisorbato 80 al 0,2 %). También puede usarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" (77) (escualano al 5 %, Pluronic L121 al 1,25 % y polisorbato 80 al 0,2 %). Se prefiere la microfluidificación.
- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter de polioxietileno alquilo (por ejemplo, éter de polioxietileno (12) cetosteárico) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monooleato de sorbitán o "Span 80"). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño menor de 200 nm. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.
- Una emulsión que tiene del 0,5-50 % de un aceite, del 0,1-10 % de un fosfolípido, y del 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Tal como se describe en la referencia 78, los componentes fosfolipídicos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gota submicrométricos son ventajosos.
- Una emulsión de aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, TWEEN 80 (TM) o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 79, producido mediante la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis-(2-hidroxietil)propanodiamina.
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno).
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno).
- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroide (por ejemplo, un colesterol) se asocian como micelas helicoidales (80).

Las emulsiones pueden mezclarse con antígeno de manera extemporánea, en el momento de la administración. Por lo tanto, el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse separados en una vacuna envasada o distribuida, lista para su formulación final en el momento de su uso. El antígeno estará generalmente en forma acuosa, de tal forma que la vacuna se prepara finalmente mezclando dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero generalmente es aproximadamente 1:1.

Agentes inductores de citocinas

Los agentes inductores de citocinas para su inclusión en composiciones de la invención son capaces, cuando se administran a un paciente, de provocar que el sistema inmunitario libere citocinas, incluyendo interferones e interleucinas. Los agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón- γ ; interleucina-1; interleucina-2; interleucina-12; TNF- α ; TNF- β ; y GM-CSF. Los agentes preferidos provocan la liberación de citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo Th1, *por ejemplo*, interferón- γ , TNF- α , Interleucina 2. Se prefiere la

estimulación tanto de interferón- γ como de interleucina-2.

Como resultado de recibir una composición de la invención, por lo tanto, un paciente tendrá linfocitos T que, cuando se estimulan con una proteína RSV F, liberarán las citocinas deseadas de un modo específico de antígeno. Por ejemplo, los linfocitos T purificados a partir de su sangre liberarán interferón- γ cuando se expongan *in vitro* a proteína F. Los procedimientos para medir dichas respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se conocen en la técnica, e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR en tiempo real. Por ejemplo, la referencia 81 comunica un estudio en el que se controlaron las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T específicas de antígeno contra el toxoide tetánico, específicamente las respuestas de interferón- γ , y se descubrió que ELISPOT era el procedimiento más sensible para discernir entre respuestas inducidas por linfocitos T específicas de antígeno y respuestas espontáneas, pero la detección intracitoplasmática de citocinas mediante citometría de flujo fue el procedimiento más eficaz para detectar efectos reestimulantes.

Los agentes inductores de citocinas para su uso en la presente invención pueden ser moduladores y/o agonistas de los receptores similares a Toll (TLR). Por ejemplo, pueden ser agonistas de una o más de las proteínas TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9 humanas. Los agentes preferidos son agonistas de TLR4 (por ejemplo, lípidos naturales modificados procedentes de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos de fosfolípidos, tales como el dímero de fosfolípido sintético, E6020), TLR7 (por ejemplo, benzonafitridinas, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos de CpG). Estos agentes son útiles para activar rutas de la inmunidad innata.

El agente inductor de citocinas puede añadirse a la composición en varias etapas durante su producción. Por ejemplo, puede estar en una composición de antígeno, o puede añadirse entonces esta mezcla a una emulsión de aceite en agua. Como alternativa, puede estar en una emulsión de aceite en agua, en cuyo caso el agente puede bien añadirse a los componentes de la emulsión antes de la formación de la emulsión, o puede añadirse a la emulsión después de la formación de la emulsión. De igual forma, el agente puede coacervarse con las gotas de la emulsión. La localización y distribución del agente inductor de citocinas en la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, *por ejemplo*, el agente puede localizarse en la fase acuosa, en la fase oleosa, y/o en la interfaz aceite-agua.

El agente inductor de citocinas puede conjugarse con un agente separado, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). Se proporciona una revisión general de técnicas de conjugación para moléculas pequeñas en la ref. 110. Como alternativa, los adyuvantes pueden asociarse no covalentemente con agentes adicionales, tal como mediante interacciones hidrófobas o iónicas.

Los agentes inductores de citocinas preferidos son (a) compuestos de benzonafitridina; (b) oligonucleótidos inmunoestimuladores y (c) 3dMPL.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos, tales como modificaciones fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (excepto para el ARN) monocatenarios. Las referencias 111, 112, y 113 desvelan posibles sustituciones análogas, *por ejemplo*, el reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se discute adicionalmente en las ref. 114 a 119. Puede dirigirse una secuencia de CpG a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT (120). La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria de Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) de CpG-A, o puede ser más específico para inducir una respuesta de células B, tal como un ODN de CpG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se discuten en las ref. 121-123. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de tal modo que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas de CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase por ejemplo, las referencias 120 y 124-126. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como PROMUNE (TM) (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como alternativa, o además, al uso de secuencias de CpG, pueden usarse secuencias de TpG (127). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG no metilados.

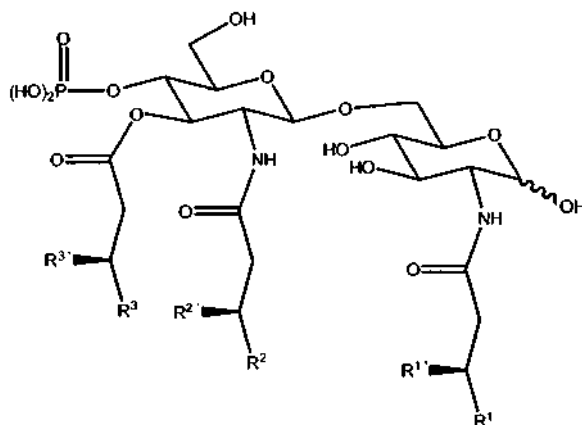
El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en cisteína. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, tal como se desvela en la ref. 127), y/o puede tener una composición nucleotídica con > 25 % de timidina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, *etc.*). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, tal como se desvela en la ref. 127), y/o puede tener una composición nucleotídica con > 25 % de citosina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, *etc.*). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG no metilados.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán típicamente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

3dMPL (también conocido como lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado o lípido A de 3-O-desacil-4'-monofosforilo) es un adyuvante en el que la posición 3 de la glucosamina del extremo reductor en el lípido A de monofosforilo se ha desacetilado. 3dMPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosas de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácidos y un grupo acilo lábil a bases. Activa células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF- α

y GM-CSF (véase también la ref. 128). La preparación de 3dMPL se describió originalmente en la referencia 129.

3dMPL puede adoptar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, variando en cuanto a su acilación (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5 o 6 cadenas de acilo, que pueden ser de diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocida como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en sus carbonos en posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2'), y hay una O-acilación en la posición 3'. El grupo unido al carbono 2 tiene la fórmula $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^1\text{R}^2$. El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^2\text{R}^3$. El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^3\text{R}^4$. Una estructura representativa es:



Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son cada uno independientemente $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$. El valor de n es preferentemente entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y es más preferentemente 10.

Los grupos R^1 , R^2 y R^3 pueden ser cada uno independientemente: (a) $-\text{H}$; (b) $-\text{OH}$; o (c) $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^4$, donde R^4 es bien $-\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, en el que el valor de m es preferentemente entre 8 y 16, y es más preferentemente 10, 12 o 14. En la posición 2, m es preferentemente 14. En la posición 2', m es preferentemente 10. En la posición 3', m es preferentemente 12. Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son por lo tanto preferentemente grupos $-\text{O}-\text{acilo}$ de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos de R^1 , R^2 y R^3 son $-\text{H}$ entonces el 3dMPL solo tiene 3 cadenas de acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando solo dos de R^1 , R^2 y R^3 son $-\text{H}$ entonces el 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Cuando solo uno de R^1 , R^2 y R^3 es $-\text{H}$ entonces el 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Cuando ninguno de R^1 , R^2 y R^3 es $-\text{H}$ entonces el 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante 3dMPL usado de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas de acilo, pero se prefiere incluir 3dMPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla, y en particular para asegurar que la forma de cadena de hexaacilo forma al menos un 10 % en peso del 3dMPL total, por ejemplo, $>20\%$, $>30\%$, $>40\%$, $>50\%$ o más. Se ha descubierto que 3dMPL con 6 cadenas de acilo es la forma más activa como adyuvante.

Por lo tanto, la forma más preferida de 3dMPL para su inclusión en las composiciones de la invención tiene fórmula (IV), mostrada a continuación.

En los casos donde se usa 3dMPL en forma de una mezcla, las referencias a las cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a las especies de 3dMPL combinadas en la mezcla.

En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro $<150\text{nm}$ o $>500\text{nm}$. Una de las dos o ambas pueden usarse con la invención, y las mejores partículas pueden seleccionarse mediante ensayo rutinario. Las partículas más pequeñas (por ejemplo, lo suficientemente pequeñas como para proporcionar una suspensión acuosa de 3dMPL) se prefieren para su uso de acuerdo con la invención debido a su actividad superior (130). Las partículas preferidas tienen un diámetro medio menor de 220 nm, más preferentemente menor de 200 nm o menor de 150 nm o menor de 120 nm, y pueden incluso tener un diámetro medio menor de 100 nm. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor de 50 nm. Estas partículas son lo suficientemente pequeñas como para ser adecuadas para esterilizarse por filtración. El diámetro de partícula puede evaluarse mediante la técnica rutinaria de dispersión de luz dinámica, que revela un diámetro medio de partícula. En los casos en los que se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, habrá generalmente una distribución de partículas aproximadas a esta media, pero al menos un 50 % en número (por ejemplo, $>60\%$, $>70\%$, $>80\%$, $>90\%$, o más) de las partículas tendrá un diámetro en el intervalo $x \pm 25\%$.

Puede usarse ventajosamente 3dMPL en combinación con una emulsión de aceite en agua. Sustancialmente todo el 3dMPL puede localizarse en la fase acuosa de la emulsión.

El 3dMPL puede usarse solo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se conoce el uso de 3dMPL en combinación con la saponina QS21 (131) (incluyendo en una emulsión de aceite en agua (132)), con un oligonucleótido inmunoestimulador, tanto con QS21 como con un oligonucleótido inmunoestimulador, con fosfato de aluminio (133), con hidróxido de aluminio (134), o tanto con fosfato de aluminio como con hidróxido de aluminio.

Adyuvantes grasos

Los adyuvantes grasos que pueden usarse con la invención incluyen las emulsiones de aceite en agua descritas anteriormente.

Adyuvantes de sal de aluminio

10 Pueden usarse los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" y "fosfato de aluminio". Estos nombres son convencionales, pero solo se usan por conveniencia, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 74). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan generalmente como adyuvantes.

15 Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, mediante espectroscopía infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de absorción a 1070cm^{-1} y un fuerte desnivel a $3090\text{-}3100\text{cm}^{-1}$ (capítulo 9 de la ref. 74). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de la banda de difracción a media altura (WHH), mostrando las partículas poco
20 cristalinas un mayor ensanchamiento de la línea debido a los tamaños cristalinos menores. El área superficial aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha demostrado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad de adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es típica para los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente aproximadamente 11, es decir, el adyuvante en sí tiene una
25 carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han comunicado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente sales de hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Pueden obtenerse mediante precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación
30 influyen el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una relación molar PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse de AlPO_4 estrictos por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales (cap. 9 de la ref. 74).

La relación molar de $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio será generalmente entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente 0,95±0,1. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, en particular para las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una
35 relación molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6mg Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será generalmente en partículas (por ejemplo, morfología de tipo placa tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas se encuentran en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han comunicado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

La carga de punto cero (PZC) del fosfato de aluminio es inversamente proporcional al grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración
45 de iones fosfato libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón, tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, *por ejemplo*, aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato o de histidina o Tris), pero no siempre es necesario. Las suspensiones
50 son preferentemente estériles y están libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden contener cloruro de sodio.

La invención puede usar una mezcla tanto de hidróxido de aluminio como de fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato que hidróxido de aluminio, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo,
55 >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferentemente menor de 10mg/ml, por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido es entre 0,3 y

1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85mg/dosis.

El componente adyuvante puede incluir uno o más adyuvantes o agentes inmunoestimuladores adicionales, aparte de incluir uno o más adyuvantes de sal de aluminio. Dichos componentes adicionales incluyen, pero sin limitación: un compuesto de benzonafitridina, un adyuvante de lípido A 3-O-desacetilado de monofosforilo ("3dMPL"); y/o una emulsión de aceite en agua. 3dMPL también se ha citado como lípido A 3-des-O-acilado de monofosforilo o como lípido A de 3-O-desacil-4'-monofosforilo. El nombre indica que la posición 3 de la glucosamina del extremo reductor en el lípido A de monofosforilo está desacetilada. Se ha preparado a partir de un mutante sin heptosas de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácidos y un grupo acilo lábil a bases. Activa células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF. La preparación de 3dMPL se describió originalmente en la referencia 129, y el producto se ha fabricado y comercializado por Corixa Corporation con el nombre MPL (TM). Pueden encontrarse detalles adicionales en las ref. 82 a 85.

Es útil el uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio, particularmente en niños, y los antígenos se adsorben generalmente a estas sales. También se prefieren las emulsiones de escualeno en agua, particularmente en los ancianos. Las combinaciones de adyuvante útiles incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2, tales como CpG y alumbre, o resiquimod y alumbre. Puede usarse una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL. Otras combinaciones que pueden usarse incluyen: alumbre y un compuesto de benzonafitridina o un SMIP, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59) y un compuesto de benzonafitridina o un SMIP, y E6040 y una emulsión de escualeno en agua, tal como MF59) o alumbre.

Las composiciones de la invención pueden provocar tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral.

Generalmente se cree que son necesarios dos tipos de linfocitos T, células CD4 y CD8, para iniciar y/o potenciar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Los linfocitos T CD8 pueden expresar un correceptor CD8 y se citan comúnmente como linfocitos T citotóxicos (CTL). Los linfocitos T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en moléculas de clase I del CMH.

Los linfocitos T CD4 pueden expresar un correceptor CD4 y normalmente se citan como linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas de clase II del CMH. Tras la interacción con una molécula de clase II del CMH, las células CD4 pueden secretar factores, tales como citocinas. Estas citocinas secretadas pueden activar a los linfocitos B, a los linfocitos T citotóxicos, macrófagos, y otras células que participan en una respuesta inmunitaria. Los linfocitos T colaboradores o células CD4+ pueden dividirse adicionalmente en dos subconjuntos funcionalmente distintos: el fenotipo TH1 y el fenotipo TH2 que difieren en su función de citocinas y efectora.

Las células TH1 activadas potencian la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específicos de antígeno) y por lo tanto son particularmente valiosos para responder a infecciones intracelulares. Las células TH1 activadas pueden secretar una o más de IL-2, IFN- γ , y TNF- β . Una respuesta inmunitaria de TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales activando macrófagos, células NK (linfocitos citolíticos naturales), y linfocitos T citotóxicos CD8 (CTL). Una respuesta inmunitaria de TH1 también puede actuar expandiendo la respuesta inmunitaria estimulando el crecimiento de linfocitos B y T con IL-12. Los linfocitos B estimulados por TH1 pueden secretar IgG2a.

Las células TH2 activadas potencian la producción de anticuerpo y por lo tanto son valiosos para responder a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas pueden secretar una o más de IL-4, IL-5, IL-6, y IL-10. Una respuesta inmunitaria de TH2 puede dar como resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria para protección futura.

Una respuesta inmunitaria potenciada puede incluir uno o más de una respuesta inmunitaria de TH1 y una respuesta inmunitaria de TH2 potenciadas.

Una respuesta inmunitaria de TH1 puede incluir uno o más de un aumento en los CTL, un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de TH1 (tal como IL-2, IFN- γ , y TNF- β), un aumento en los macrófagos activados, un aumento en la actividad de NK, o un aumento en la producción de IgG2a. Preferentemente, la respuesta inmunitaria potenciada de TH1 inducirá un aumento en la producción de IgG2a.

Puede provocarse una respuesta inmunitaria de TH1 usando un adyuvante de TH1. Un adyuvante de TH1 provocará generalmente niveles aumentados de producción de IgG2a en relación a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de saponina, virosomas y partículas pseudovirales, derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como los oligonucleótidos que contienen un motivo de CpG, son adyuvantes de TH1 preferidos para su uso en la invención.

Una respuesta inmunitaria de TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de TH2 (tal como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un aumento en la producción de IgG1,

IgE, IgA y linfocitos B de memoria. Preferentemente, la respuesta inmunitaria potenciada de TH2 inducirá un aumento en la producción de IgG1.

5 Puede provocarse una respuesta inmunitaria de TH2 usando un adyuvante de TH2. Un adyuvante de TH2 provocará generalmente niveles aumentados de producción de IgG1 en relación a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH2 adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones de aceite, y toxinas ribosilantes de ADP y derivados detoxificados de las mismas. Las composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio son adyuvantes de TH2 preferidos para su uso en la invención.

10 Una composición puede incluir una combinación de un adyuvante de TH1 y un adyuvante de TH2. Preferentemente, dicha composición provoca una respuesta potenciada de TH1 y una respuesta potenciada de TH2, es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 como de IgG2a en relación a la inmunización sin un adyuvante. Aún más preferentemente, la composición que comprende una combinación de un adyuvante de TH1 y de TH2 provoca una respuesta inmunitaria de TH1 aumentada y/o de TH2 aumentada en relación a la inmunización con un solo adyuvante (es decir, en relación a la inmunización con solo con un adyuvante de TH1 o la inmunización solo con un adyuvante de TH2).

15 La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria de TH1 y una respuesta inmunitaria de TH2. Preferentemente, la respuesta inmunitaria proporciona una o ambas de una respuesta de TH1 potenciada y una respuesta de TH2 potenciada.

20 La respuesta inmunitaria potenciada puede ser una o ambas de una respuesta sistémica y una mucosal. Preferentemente, la respuesta inmunitaria proporciona una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica potenciada y una mucosal potenciada. Preferentemente, la respuesta inmunitaria mucosal es una respuesta inmunitaria de TH2. Preferentemente, la respuesta inmunitaria mucosal incluye un aumento en la producción de IgA.

Procedimientos de tratamiento, y de administración

25 Las composiciones de la invención son adecuadas para su administración a mamíferos, y la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero.

30 Las composiciones (por ejemplo, una composición inmunogénica) puede usarse para producir una formulación de vacuna para inmunizar a un mamífero. El mamífero es típicamente un ser humano, y el ectodominio de proteína RSV F es típicamente un ectodominio de proteína RSV F humana. Sin embargo, el mamífero puede ser cualquier otro mamífero que sea susceptible a la infección por RSV, tal como una vaca que pueda infectarse por RSV bovino. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede suscitarse después de la administración de una proteína RSV F purificada, de una partícula de alfavirus, o de un ARN autorreplicante.

La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento, *por ejemplo*, para su uso en la inmunización de un paciente contra la infección por RSV.

35 La invención también proporciona el uso de un polipéptido tal como se describe anteriormente para la fabricación de un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria en un paciente.

La respuesta inmunitaria suscitada por estos procedimientos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos después de la vacunación contra RSV se conocen bien en la técnica.

40 Las composiciones de la invención pueden administrarse de una serie de formas adecuadas, tal como inyección intramuscular (por ejemplo, en la pierna o brazo), inyección subcutánea, administración intranasal, administración oral administración intradérmica, administración transcutánea, administración transdérmica, y similares. La ruta de administración adecuada dependerá de la edad, salud y otras características del mamífero. Un médico será capaz de determinar una ruta de administración adecuada basándose en estos y otros factores.

45 Las composiciones inmunogénicas, y las formulaciones de vacuna, pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos, incluyendo mujeres gestantes. Por lo tanto, un sujeto puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los sujetos preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, >50 años de edad, >60 años de edad, y preferentemente >65 años), los jóvenes (por ejemplo, <6 años de edad, tal como de 4 - 6 años de edad, <5 años de edad), y mujeres gestantes. Estas vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos, sin embargo, y pueden usarse de manera más general en una población.

50 El tratamiento puede ser una pauta de una sola dosis o una pauta de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en una pauta de inmunización primaria y/o en una pauta de inmunización de refuerzo. En una pauta de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma o por diferentes rutas, *por ejemplo*, un cebado parenteral y un refuerzo mucosal, un cebado mucosal y un refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en los pacientes inmunológicamente no expuestos previamente.

Se aplicarán múltiples dosis separadas por al menos 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, y similares).

- 5 Las formulaciones de vacuna producidas usando una composición de la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente a la vez que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional de la salud o centro de vacunación) otras vacunas.

Aspectos adicionales de la invención

- 10 La invención también proporciona un polipéptido (por ejemplo, polipéptido recombinante) que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en el que (i) el primer dominio comprende un ectodominio de glucoproteína RSV F, en su totalidad o en parte, tal como se define en la reivindicación 1, y (ii) el segundo dominio comprende un dominio de oligomerización heterólogo. Se proporcionan anteriormente detalles adicionales. Si el dominio de oligomerización comprende una secuencia de héptada (por ejemplo, la secuencia de GCN descrita anteriormente) entonces está preferentemente en fase de repetición de héptada con la secuencia HR2 (en caso de que esté presente) del ectodominio.

15 La invención también proporciona un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica este polipéptido. También proporciona vectores que incluyen dichos ácidos nucleicos, y células hospedadoras que incluyen dichos vectores. Los vectores pueden usarse para, *por ejemplo*, fines de expresión recombinante, inmunización de ácido nucleico, etc.

- 20 La invención también proporciona una composición que comprende moléculas que comprenden ectodominios de glucoproteína RSV F, en las que los ectodominios de al menos el 50 % (por ejemplo, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %) de las moléculas están presentes en una conformación pre-fusión.

Otros virus

- 25 Además de usarse con RSV humano, la invención puede usarse con otros miembros de los *Pneumoviridae* y *Paramyxoviridae*, incluyendo, pero sin limitación, virus respiratorio sincitial bovino, parainfluenzavirus 1, parainfluenzavirus 2, parainfluenzavirus 3, y parainfluenzavirus 5.

- 30 La invención también proporciona una composición que comprende moléculas que comprenden ectodominios de glucoproteína RSV F de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los ectodominios de al menos el 50 % (por ejemplo, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %) de las moléculas están presentes en una conformación pre-fusión o una conformación intermedia.

Polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F

- 35 En algunas realizaciones de la invención se usan o incluyen polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F particulares. Algunos de los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F particulares contienen secuencias de aminoácidos alteradas desde aproximadamente la posición 100 a aproximadamente la posición 161. Las secuencias de aminoácidos desde la posición 100 hasta la posición 150 para varios polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F particulares se muestran en la FIG. 1C. Las secuencias de aminoácidos de varios polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F particulares se presentan en el presente documento, por ejemplo, en el ejemplo 1.

General

- 40 La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. En caso necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

- 45 El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

A menos que se afirme específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclado de dos o más componentes no requiere cualquier orden de mezclado específico. Por lo tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. En los casos donde hay tres componentes, pueden combinarse dos componentes entre sí, y después la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

- 50 En los casos donde se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalomielitosis espongiforme transmisible (TSE), y en particular libre de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general, se prefiere cultivar las células en total ausencia de materiales procedentes de animales.

En los casos donde se administre un compuesto al organismo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede como alternativa reemplazarse por un profármaco adecuado.

5 En los casos donde se use un sustrato celular para procedimientos de reordenamiento o de genética inversa, es preferentemente uno que se haya aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en el capítulo 5.2.3 de la farmacopea europea.

La identidad entre secuencias polipeptídicas se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de hueco afín con los parámetros de penalización de hueco abierto = 12 y penalización por extensión de hueco = 1.

Tabla 1. Difosfolípidos

DDPC	1,2-didecanoil- <i>sn</i> -Glicero-3 -fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil- <i>sn</i> -Glicero-3 [fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil- <i>sn</i> -Glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-Dilauroil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil- <i>sn</i> -Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPS	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-difitanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-Fosfato
DSPC	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenada
HSPC	PC de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenada
LYSOPC MYRISTIC	1-Miristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMITIC	1-Palmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC STEARIC	1-Estearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC de esfingomielina de leche	1-Miristoil,2-palmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina

(continuación)

MSPC	1-Miristoil,2-estearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-Palmitoil,2-miristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoil,2-oleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil,2-oleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PSPC	1-Palmitoil,2-estearoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil,2-miristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Estearoil,2-oleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Estearoil,2-palmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfatidilcolina

Ejemplificación**Ejemplo 1 - Polipéptidos de RSV F**

5 Este ejemplo proporciona secuencias de una serie de ejemplos de polipéptidos (por ejemplo, que contienen secuencia de señal) y de secuencias de ácido nucleico que pueden usarse para expresar polipéptidos de RSV F de la presente invención. Las secuencias de aminoácidos presentadas incluyen el péptido de señal y contienen un enlazador C-terminal opcional y marcador His (GGGAGSGH - HHHHH (SEC ID N°: 90)). Cuando estos polipéptidos se producen en células hospedadoras, el polipéptido se procesará normalmente por la célula para eliminar el péptido de señal y, como se describen en este documento, algunos de los polipéptidos se escindirán, por ejemplo, en sitios de escisión de furina no modificados.

10 Un ejemplo de escisión de furina de tipo silvestre es HIS truncado de RSV F de tipo silvestre (SEC ID N°: 84).

Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse en forma de monómeros incluyen: RSV F Furx (SEC ID N°: 45); RSV F antiguo furx HIS truncado (SEC ID N°: 88); RSV F Furx R113Q K123N K124N HIS truncado (SEC ID N°: 89); RSV F delP21 furx HIS truncado (SEC ID N°: 47); y RSV F delP23 furx HIS truncado (SEC ID N°: 48).

15 Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse en forma de trímeros incluyen: RSV F N-terminal Furina HIS truncado (SEC ID N°: 85); RSV F eliminación de fusión HIS truncado (SEC ID N°: 67); y RSV F eliminación de fusión 2 HIS truncado (SEC ID N°: 68).

20 Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse en forma de monómeros o rosetas de trímeros incluyen: RSV F furmt HIS truncado (SEC ID N°: 50); RSV F furdel HIS truncado (SEC ID N°: 51); RSV F delP21 furdel HIS truncado (SEC ID N°: 86); y RSV F delP23 furdel HIS truncado (SEC ID N°: 49), y RSV F Factor Xa HIS truncado (SEC ID N°: 52).

Un ejemplo de una escisión de tipo silvestre que probablemente produce una formación de roseta es RSV F C-terminal Furina HIS truncado (SEC ID N°: 87).

Completo

25 El siguiente ejemplo es un polipéptido de RSV F de longitud completa.

```

1  MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRLGFL LGVGSIAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYVYN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN (SEC ID N°: 21)

```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

ES 2 563 730 T3

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG

 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTTC TGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
 1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACTGAAG (SEC ID N°: 22)

HIS completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido RSV F de longitud completa seguido de un marcador de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNIYID KQLLPVIVNQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTTVPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLFLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNSGGSAG SGHHHHHH (SEC ID N°: 23)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGACAGATC
 841 GTGCGGAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGG
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCTGTTC
 1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACAGCGGGC CAGCGCCGGC
 1741 TCTGGCCACC ACCACCATCA CCACTGAAG (SEC ID N°: 24)

pre HIS completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido RSV F de longitud completa con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) unido en el extremo C-terminal del polipéptido RSV F seguido de un marcador de hexa-histidina.

```

1  MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE BFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNRRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTFPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKKEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGRM KQIEDKIEEI LSKIYHIENE
601 IARIKKLIGE SGGSGSGHH HHHH (SEC ID N° : 25)

```

- 5 La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

ES 2 563 730 T3

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
 1681 AAGGACCAGC TGCCCGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCCGGATG
 1741 AAGCAGATCG AGGACAAGAT CGAGGAAATC CTGAGCAAGA TCTACCACAT CGAGAACGAG
 1801 ATCGCCCGGA TCAAGAAGCT GATCGGCGAA AGCGGCGGCT CTGCCGGAAG CGGCCACCAC
 1861 CACCATCACC ACTGAAG (SEC ID N°: 26)

pre HIS completo 2

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido RSV F de longitud completa con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) unido en el extremo C-terminal del polipéptido RSV F seguido de un marcador de hexa-histidina.

ES 2 563 730 T3

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTINVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNIYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGSG RMKQIEDKIE EILSKIYHIE
 601 NEIARIKKLI GESGGSAGSG HHHHHH (SEC ID N°: 27)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
 1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAGCGGC
 1741 CGGATGAAGC AGATCGAGGA CAAGATCGAG GAAATCCTGA GCAAGATCTA CCACATCGAG
 1801 AACGAGATCG CCCGGATCAA GAAGCTGATC GCGGAAAGCG GCGGCTCTGC CGGAAGCGGC
 1861 CACCACCACC ATCACCACCTG AAG (SEC ID N°: 28)

ecto HIS

El siguiente polipéptido incluye el ectodominio del polipéptido RSV F seguido de un marcador de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNQVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN
 241 AGVTTVPVSTY MLTNSSELLSL INDMPIITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNMSGG SAGSGHHHHH H
 (SEC ID N°: 29)

- 5 La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGCCAAGGT GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TAGCGGCGGC
 1561 AGCGCCGGCT CTGGCCACCA CCACCATCAC CACTGAAG (SEC ID N°: 30)

ecto pre HIS

5 El siguiente polipéptido incluye el ectodominio del polipéptido RSV F con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) insertado en el polipéptido RSV F cadena arriba de donde podría haber estado el dominio TM de la proteína RSV (comenzando en el a.a. 517) seguido de un marcador de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNDKI EEILSKIYHI ENEIARIKKL
 541 IGESGGSAGS GHHHHHH (SED ID N°: 31)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCCGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGACAAGATC
 1561 GAGGAAATCC TGAGCAAGAT CTACCACATC GAGAACGAGA TCGCCCGGAT CAAGAAGCTG
 1621 ATCGGCGAAA GCGGCGGCTC TGCCGGAAGC GGCCACCACC ACCATCACCA CTGAAG
 (SEC ID N°: 32)

full pre HA HIS

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido RSV F de longitud completa con el dominio de trimerización post-fusión del polipéptido de hemaglutinina de la gripe (subrayado) unido al extremo C-terminal del polipéptido de RSV F seguido de un marcador de hexa-histidina.

5

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVINKQ SCSISNIETV IEFQKQNNRL LEITREFSVN

241 AGVTTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGNE KFHQIEKEFS EVEGRIQDLE
 601 KSGGSAGSGH HHHHH (SEC ID N°: 33)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGCGTGTA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTFTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCOG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATGTGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
 1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAATGAG
 1741 AAGTTCACC AGATCGAGAA AGAATTCAGC GAGGTGGAGG GCCGGATCCA GGACCTGGAA
 1801 AAGAGCGGCG GCTCTGCCGG AAGCGGCCAC CACCACCATC ACCACTGAAG
 (SEC ID N°: 34)

ecto pre HA HIS

El siguiente polipéptido incluye el ectodominio del polipéptido RSV F con el dominio de trimerización post-fusión del polipéptido de hemaglutinina de la gripe (subrayado) insertado en el polipéptido RSV F cadena arriba de donde podría haber estado el dominio TM de la proteína RSV (comenzando en el a.a. 517) seguido de un marcador de hexa-histidina.

5

```

1  MELLILKANA  ITTILTAVTF  CFASGQNITE  EFYQSTCSAV  SKGYLSALRT  GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN  GTDAKVKLIK  QELDKYKNAV  TELQLLMQST  PATNNRARRE  LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN  KKRKRRFLGF  LLGVGSAIAS  GVAVSKVLHL  EGEVNIKISA  LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS  KVLDLKNYID  KQLLPIVNKQ  SCSISNIETV  IEFQQKNRNL  LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY  MLTNSELLSL  INDMPTINDQ  KKLMSNNVQI  VRQSYSIMS   IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID  TPCWKLHTSP  LCTTNTKEGS  NICLTRTRDRG  WYCDNAGSVS  FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM  NSLTLPSEVN  LCNVDIFNPK  YDCKIMTSKT  DVSSSVITSL  GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG  IIKTFSNGCD  YVSNKGVDTV  SVGNTLYYVN  KQEGKSLYVK  GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA  SISQVNEKIN  QSLAFIRKSD  ELLHNVNEKF  HQIEKEFSEV  EGRIQDLEKS
541 GGSAGSGHHH  HHH (SEC ID N°: 35)

```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

```

1  ATGGAACTGC  TGATCCTGAA  GGCCAACGCC  ATCACCACCA  TCCTGACCGC  CGTGACCTTC
61  TGCTTCGCCA  GCGGCCAGAA  CATCACCGAG  GAATTCTACC  AGAGCACCTG  CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT  ACCTGAGCGC  CCTGCGGACC  GGCTGGTACA  CCAGCGTGAT  CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA  TCAAAGAAAA  CAAGTGCAAC  GGCACCGACG  CCAAGGTGAA  ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG  ACAAGTACAA  GAACGCCGTG  ACCGAGCTGC  AGCTGCTGAT  GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA  ACAACCGGGC  CAGAAGAGAG  CTGCCCCGGT  TCATGAACTA  CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA  AAACCAACGT  GACCCTGAGC  AAGAAGCGGA  AGCGGCCGTT  CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG  TGGGCAGCGC  CATCGCCAGC  GGGGTGGCCG  TGTCCAAGGT  GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG  TGAACAAGAT  CAAGTCCGCC  CTGCTGTCCA  CCAACAAGGC  CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG  GCGTGAGCGT  GCTGACCAGC  AAGGTGCTGG  ATCTGAAGAA  CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC  TGCCCATCGT  GAACAAGCAG  AGCTGCAGCA  TCAGCAACAT  CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC  AGCAGAAGAA  CAACCGGCTG  CTGGAAATCA  CCCGGGAGTT  CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA  CCACCCCGT  GAGCACCTAC  ATGCTGACCA  ACAGCGAGCT  GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA  TGCCCATCAC  CAACGACCAG  AAAAAGCTGA  TGAGCAACAA  CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC  AGAGCTACTC  CATCATGAGC  ATCATCAAAG  AAGAGGTGCT  GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC  CCCTGTACGG  CGTGATCGAC  ACCCCCTGCT  GGAAGCTGCA  CACCAGCCCC

```

ES 2 563 730 T3

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGAGAAGTTC
 1561 CACCAGATCG AGAAAGAATT CAGCGAGGTG GAGGGCCGGA TCCAGGACCT GGAAAAGAGC
 1621 GCGGGCTCTG CCGGAAGCGG CCACCACCAC CATCACCCT GAAG (SEC ID N°: 36)

fullAHRB HIS

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido RSV F de longitud completa con el dominio HRB eliminado seguido de un marcador de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQHITE EPHYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 181 LSNVSVLTS KVLDLKQYID KQLLPVINKQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRIDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPNIMITTI
 481 IIVIIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNMGGSHH HHHH
 (SEC ID N°: 37)

5

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAA CAAGTGC AAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCGGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCAGCCCA ATATCATGAT CACCACAATC
 1441 ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC
 1501 AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC
 1561 GCCTTCTCCA ACATGGGGGG TTCTCATCAT CATCATCATC ATTGAAG

(SEC ID N°: 38)

ecto

El siguiente polipéptido incluye solo el ectodominio del polipéptido RSV F.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNQVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVFNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRL LEITREFSVN
 241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIEEVLAVV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASKNKRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTN (SEC ID N°: 39)

5

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia polipeptídica anterior.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGG
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCCG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCG CGACACCATG AACAGCCTGA CCTTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCAGGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATTGAAG (SEC ID N°: 40)

RSV F longitud completa

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVI TIELSNIKENKCN
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRRFLGF
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPV NKQ
 SCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYKGT
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPI I NFDPLVFP SDEFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITIIIVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLS
 KDQLSGINNI AFSN (SEC ID N°: 41)

RSV F escisión de enterocinasa idealizada

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVI TIELSNIKENKCN
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRRFLGF
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPV NKQ
 SCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS

FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGDDDDDKGSGSGIMITTI IIVIIVILLSLIAV
GLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N° : 42)

RSV F escisión de trombina idealizada

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK KLSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSLVPRGSGSGIMITTI IIVIIVILLSLIAVGL
LLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N° : 43)

RSV F escisión de factor Xa idealizada

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK KLSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSIEGRGSGSGIMITTI IIVIIVILLSLIAVGL
LLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N° : 44)

5

RSV F furx HIS truncado

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK KLSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N° : 45)

RSV F furx R113Q, K123N, K124N HIS truncado

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNVTL SQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK KLSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N° : 46)

RSV F furx R113Q, K123Q, K124Q HIS truncado

MELLILKANAIITTI L TAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTINVTLSQNNQNFGLF
 LLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQ
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIINDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPDEFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 93)

RSV F delP21 furx HIS truncado

MELLILKANAIITTI L TAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQ-----
 QNQNQNFGLFLLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYID
 KQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIINDQ
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG
 WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYD
 LVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH
 (SEC ID N°: 47)

5 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F delP23 furx HIS truncado

MELLILKANAIITTI L TAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQ-----
 QNQNQNFGLFLLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
 LLPIVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIINDQKK
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
 IVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 48)

10 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F delP23 furdel HIS truncado

MELLILKANAIITTI L TAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----
 QQQRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
 LLPIVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIINDQKK
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
 IVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 49)

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

15

RSV F furmt HIS truncado

MELLILKANAIITTI LTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKKKFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 50)

RSV F furdel HIS truncado

MELLILKANAIITTI LTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKK - - -
RFLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP
I VNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMS
NNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDN
AGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI V S
CYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP S
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 51)

5 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F Factor Xa HIS truncado

MELLILKANAIITTI LTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNI EGRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKIEGRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 52)

RSV F enlazador corto Foldon HIS

MELLILKANAIITTI LTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKR RFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGSGYI PEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSAGSG
HHHHHH (SEC ID N°: 53)

RSV F enlazador largo Foldon HIS

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI IINFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNKNDDKSGSYI PEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 54)

RSV_F_ecto_pre_his

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI IINFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH
(SEC ID N°: 55)

5 ECTO PRE HA HIS

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRFLGF

LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI IINFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKSGGSAGSGHHHHH
(SEC ID N°: 56)

RSV F ECTO Furx GCN HIS

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAANTNVTL SQNQNFGLF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI IINFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH
(SEC ID N°: 57)

RSV F ECTO delp21 GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----
 QNQNQNFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYID
 KQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG
 WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL
 GAIVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDP
 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 58)

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F ECTO delp23 Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----
 QNQNFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
 LLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
 IVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN

DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 59)

5

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F ECTO delp23 Furdel GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----
 QQQRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
 LLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
 IVSCYKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 60)

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

10

RSV F longitud completa Furx

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNANNTNVTLSONQNQNFLGF
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
 SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDAS
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN
 (SEC ID N°: 61)

RSV F longitud completa delp21

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQ-----
 QNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYID
 KQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQ
 KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG
 WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL
 GAIVSCYGKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDP
 LVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N°: 62)

5 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F longitud completa p23 Furx GCN HIS

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQ-----
 QNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQ
 LLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKK
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
 IVSCYGKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N°: 63)

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F longitud completa p23 Furdel GCN HIS

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARQ-----
 QQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQ
 LLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKK
 LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
 IVSCYGKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
 FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N°: 64)

10 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F N-terminal Furina Furx HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSSKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 65)

RSV F C-terminal Furina Furx HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSONQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI

VRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 66)

5

RSV F eliminación de fusión 1 HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRSAIA
SGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIET
VIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIM
SI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCK
VQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNK
NGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKI
NQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 67)

RSV F eliminación de fusión 2 HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISN
IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY
SIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAE
TCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASN
KNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVN
EKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 68)

10

RSV F Furx HIS truncado

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSONQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFD
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 69)

RSV F Furx truncado

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSONQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI

VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFD
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTN (SEC ID N°: 70)

5 RSV F delP23 furdel truncado sin HIS (para células CHO)

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----
QQQRFLGFLGVLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
LLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKK
LMSNNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLG
IVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLV
FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTN (SEC ID N°: 71)

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está eliminado)

RSV F (ts) HIS truncado

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFD
SISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 84)

RSV F antiguo furx HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELQRFMNYTLNNAANTNVTLSONQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 88)

RSV F Furx R113Q K123N K124N HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSONQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ

SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 89)

5 RSV F N-terminal Furina HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRREL PQFMNYTLNNAQQTNVTLSONQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKT
KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 85)

RSV F delP21 furdel HIS truncado

MELLILKANAIITTIILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----
QNQQRFLGFL LGVSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYID
KQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQ
KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRG
WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL
GAI VSCYGKTCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDP
LVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 86)

RSV F C-terminal Furina HIS truncado

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSSKKRKRFLGF
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVVKQ
 SCSISNIETVIEFQQKNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTK
 KCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDHELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 87)

Ejemplo 2 - Expresión y purificación de construcciones de RSV F

5 Las construcciones RSV F ECTo y truncada, que carecen del dominio transmembrana y de la región de la cola
 citoplasmática bien con sitios de escisión de furina de tipo silvestre o que portan mutaciones *knockout* para los sitios
 de escisión de furina y con o sin mutaciones de estabilización pre-fusión, se clonaron en un vector de expresión de
 baculovirus pFastBac (Invitrogen). Varias de estas construcciones contienen un enlace flexible en C-terminal
 seguido de una secuencia marcadora His₆ usada para purificación de quelación. La producción de reservas de
 10 baculovirus de alto título se pasó en células de insecto Sf9. Las proteínas se expresaron infectando células Sf9, Tn5
 o High Five con el baculovirus requerido y cosechando el medio sobrenadante dos o tres días después de la
 infección, controlada mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-RSV F o anti-6HIS.

15 El medio de expresión a gran escala se concentró/purificó mediante una de dos estrategias generales para eliminar
 el efecto perjudicial de la ferritina presente en el medio de células de insecto de romper la resina quelante. La
 primera estrategia fue concentrar los aproximadamente 10-20 litros de medio de expresión de insecto hasta
 aproximadamente 300 ml usando una columna de concentración de fibra de tubo hueco de GE Healthcare. Se
 añadió sulfato de cobre a esta mezcla concentrada hasta una concentración final de 500 µM y la solución resultante
 se cargó en columnas quelantes HiTrap de 5 ml. La proteína marcada con HIS unida se eluyó entonces de la
 columna con Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

20 En la segunda estrategia de purificación, se añadió CuCl₂ al sobrenadante del medio a una concentración final de
 500 µM. A cada 1 litro de medio, se le añadieron cuatro mililitros de resina de quelación (Resina quelante, BioRad) y
 se mecó la lechada durante al menos treinta minutos a 4 grados centígrados y se separaron la resina y el medio
 mediante una columna de gravedad. La resina se lavó con tres veces el volumen de columna del tampón de
 equilibrado (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM) y la proteína F se eluyó con tres veces el volumen de columna de
 25 tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 250 mM). La elución se dializó contra tampón His 25 mM, pH
 7,5, y la solución resultante se cargó en una columna de quelación Hitrap de 5 ml cargada con NiSO₄ y se eluyó con
 Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

30 Las eluciones del gradiente de imidazol en cualquiera de los dos casos se evaluaron usando un Western anti-6HIS y
 geles de coomasie. Se recogieron las fracciones que contenían construcciones puras, se dializaron contra diferentes
 soluciones de tampón/salino y se concentraron para su análisis posterior usando concentradores Centriprep de
 Millipore y/o unidades de concentración Vivaspin. También se ha desarrollado un protocolo de purificación de
 exclusión por tamaño capaz de purificar adicionalmente trímeros de RSV monodispersos a partir de rosetas (a
 continuación).

Análisis SEC de proteínas RSV F:

35 Una característica documentada de otras proteínas de fusión de paramyxovirus estabilizadas en su conformación
 pre-fusión es que, incluso cuando se escinden de tal forma que se expone el péptido de fusión, no forman rosetas,
 tal como se observa para la conformación post-fusión. Un simple análisis de cromatografía de exclusión por tamaño
 permite la identificación de una proteína y la determinación de si una proteína está formando rosetas. Se
 desarrollaron dos procedimientos, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también sirven como una etapa de purificación
 eficaz.

40 La HPLC-SEC se llevó a cabo usando una columna de SEC de BioRad (18 mm) con una fase móvil de Tris 25 mM,
 pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de HPLC-SEC de Biorad para calibrar el sistema, los presentes inventores
 descubrieron que las rosetas de RSV (que representan conformaciones post-fusión escindidas) eluyen en el
 volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de RSV (supuestos trímeros de
 análisis EM posterior) eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa.

45 La FPLC-SEC se llevó a cabo en un FPLC de GE Healthcare usando una columna Superdex 200 16/60 con fase
 móvil de Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de alto peso molecular de GE Healthcare para calibrar
 el sistema, los presentes inventores descubrieron que las rosetas de RSV eluyen en el volumen vacío de la columna

del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de RSV eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa.

Microscopía electrónica (EM) de proteínas RSV F.

5 Se absorbieron soluciones de proteína de aproximadamente 50 microgramos por ml de construcciones de RSV F sobre rejillas sin brillo recubiertas de carbono y se tiñeron negativamente con fosfotungstato de sodio al 2 % (pH 7,0) o formato de uranilo al 0,75 % (bajo pH no cuantificado). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Technai Spirit o JOEL 1230 operando a entre 80-120 kV con un aumento entre 20.000 y 150.000 dependiendo de la resolución necesaria.

Tabla 2

Construcción	Conformación mediante EM
RSV F ECTO HIS	Predominantemente rosetas
RSV F Furdel ECTO (escindido)	Predominantemente rosetas
RSV F Delp23 Furdel truncado (no escindido)	Trímeros observados
RSV F péptido de fusión eliminación 1 truncado (no escindido)	Trímeros
RSV F Delp23 Furdel Truncado (escindido por tripsina después de la purificación)	Predominantemente rosetas con algunos trímeros
RSV F Delp23 Furdel Truncado (escindido por tripsina después de la purificación en presencia de disco de nanolípidos)	Rosetas asimétricas con disco de nanolípidos aparente en el centro de la roseta

10

Ejemplo 3 - Detección de RSV F pre-fusión y post-fusión

15 Hay disponible una serie de procedimientos para determinar la conformación de la proteína RSV F para ensayar si una modificación al polipéptido de RSV F o una molécula añadida desfavorece la conformación post-fusión. Los ejemplos incluyen la asociación de liposomas, anticuerpos monoclonales específicos de conformación (incluyendo los que se usan en FACS, ELISA, etc.), microscopía electrónica, sensibilidad a proteasas diferencial entre las conformaciones, cromatografía de filtración en gel, ultracentrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, experimentos de RMN de intercambio de deuterio, espectroscopia de masas, espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, espectroscopía de triptófano y cristalografía de rayos X.

Asociación de liposomas

20 La asociación de liposomas puede usarse para ensayar la conformación de la proteína RSV F. Las formas solubles de la proteína RSV F en la conformación pre-fusión no se asociarán con liposomas mientras que la conformación post-fusión se asociará con liposomas.

25 Los liposomas pueden prepararse del modo siguiente: Se mezclan 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, y colesterol en cloroformo (disponibles a través de Avanti Polar Lipids) a una relación molar 8:2:5. El cloroformo se evapora en atmósfera de argón. Se formará una película de lípido que se seca al vacío durante toda la noche y se resuspende en PBS hasta 40 mM de lípido total. Después de cinco ciclos de congelación-descongelación, se agitan vorticialmente los lípidos y se extruyen 21 veces a través de filtros de 100 µm usando una miniextrusora (disponible a través de Avanti Polar Lipids).

30 Una vez que se han preparado los liposomas, puede llevarse a cabo el ensayo de asociación con liposomas. Para cada muestra que se va a ensayar, se escinden 2 µg del polipéptido de RSV F que se va a ensayar con 25 miliunidades de tripsina (disponible a través de Worthington Biochemical) en tampón fosfato 100 mM (pH 7,1) durante 30 min a 25 °C. Después de la escisión, se añaden 40 pg de inhibidor de tripsina de soja (disponible a través de Worthington Biochemical) a cada muestra para terminar la reacción. Las muestras se pretratan a 60 °C durante 30 min lo que podría inducir un cambio conformacional desde la forma pre-fusión a la forma post-fusión en la proteína RSV F aislada nativa. Se añaden los liposomas (40 µl por muestra) y PBS (volumen final de 80 µl), y las muestras se incuban a 60 °C durante 30 min. Se añade sacarosa a una concentración final del 50 % (volumen final de 500 µl). Las muestras se recubren con 500 µl cada una de sacarosa al 40 %, sacarosa al 25 %, y PBS y se centrifugan en un rotor TLS55 a 49.000 rpm durante 3 h a 25 °C. Las fracciones (500 µl) se recogen de la parte superior de los gradientes. Las proteínas se solubilizan en Triton X-100 al 0,5 % y se precipitan usando ácido tricloroacético al 12,5 % vol/vol. Los polipéptidos se separan mediante SDS/PAGE y se transfieren a membranas de PVDF. Las transferencias se sondan con anticuerpos monoclonales anti-RSF V.

40

Microscopía electrónica

- Se usó microscopía electrónica para ensayar la distribución conformacional de los polipéptidos RSV F. Los polipéptidos RSV F en la forma pre-fusión tienen una forma de "bola y tallo" con una longitud de ~12 nm. Por el contrario, los polipéptidos en la forma post-fusión tienen una forma de "tee de golf" con una longitud de ~16 nm.
- 5 Además, los péptidos de fusión en el extremo estrecho de los "tee de golf" se agregan para formar estructuras de rosetas. Por lo tanto, puede usarse la microscopía electrónica para ensayar la distribución de las conformaciones en una muestra de polipéptidos de RSV F debido a las formas fácilmente distinguibles.

Ejemplo 4 - Trímeros y rosetas de ectodominio de RSV F

- 10 Las construcciones de ectodominio de proteína RSV F, que codifican polipéptidos que carecen del dominio transmembrana y de la región de la cola citoplasmática bien con sitios de escisión de furina de tipo silvestre o que portan mutaciones *knockout* en los sitios de escisión de furina y/o mutaciones de péptido de fusión, se clonaron en un vector de expresión de baculovirus pFastBac (Invitrogen). Varias de estas construcciones contienen un enlazador flexible en C-terminal seguido de una secuencia marcadora His₆ usada para purificación de quelación. La producción de reservas de baculovirus de alto título se obtuvo mediante pase en células de insecto Sf9. Las proteínas se expresaron infectando células Sf9, Tn5 o High Five con el baculovirus requerido y cosechando el medio sobrenadante condicionado dos o tres días después de la infección. La producción de proteína se controló mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-RSV F o anti-HIS₆.

- 20 El medio de expresión a gran escala se concentró/purificó usando una de dos estrategias generales para eliminar el efecto perjudicial de la ferritina presente en el medio de células de insecto que pueden corromper la resina quelante. La primera estrategia fue concentrar los aproximadamente 10-20 litros de medio de expresión de insecto hasta aproximadamente 300 ml usando una columna de concentración de fibra de tubo hueco de GE Healthcare. Se añadió sulfato de cobre a esta mezcla concentrada a una concentración final de 500 µM, y se cargó la solución resultante en columnas quelantes HiTrap de 5 ml. La proteína marcada con HIS unida se eluyó entonces de la columna con Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

- 25 En la segunda estrategia de purificación, se añadió CuCl₂ sobrenadante del medio a una concentración final de 500 µM. A cada 1 litro de medio, se añadieron aproximadamente de cuatro a diez mililitros de resina quelante (resina quelante, BioRad), y la lechada se mecía durante al menos treinta minutos a 4 grados centígrados, y se separaron la resina y el medio usando una columna de gravedad. La resina se lavó con aproximadamente diez veces el volumen de columna de tampón de equilibrado (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM), y se eluyó el ectodominio de la proteína F con aproximadamente diez veces el volumen de columna de tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 250 mM). La elución se dializó contra tampón His 25 mM, pH 7,5, y la solución resultante se cargó en una columna de quelación HiTrap de 5 ml cargada con NiSO₄. La proteína unida se eluyó con Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

- 35 Las eluciones del gradiente de imidazol en cada caso se evaluaron usando transferencias de Western anti-HIS₆ y/o geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Se recogieron las fracciones que contenían construcciones puras, se dializaron contra diferentes soluciones de tampón/salino y se concentraron para su análisis posterior usando concentradores Centriprep de Millipore y/o unidades de concentración Vivaspín. En algunos casos, se purificaron adicionalmente los monómeros, trímeros o rosetas usando cromatografía de exclusión por tamaño.

Análisis y purificación SEC de ectodominios de RSV F

- 40 Se usó cromatografía de exclusión por tamaño para purificar y analizar monómeros, trímeros y rosetas de ectodominio de proteína RSV F. Este procedimiento también permitió que se purificasen ectodominios de proteína RSV F no escindida de células hospedadoras o lípidos y lipoproteínas contaminantes procedentes del medio. Se desarrollaron dos procedimientos, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también puede servir como una etapa de purificación eficaz.

- 45 La HPLC-SEC se llevó a cabo usando una columna de SEC de BioRad (18 mm) con una fase móvil de Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de HPLC-SEC de Biorad para calibrar el sistema, los presentes inventores descubrieron que las rosetas de RSV (que representan conformaciones post-fusión escindidas) eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los monómeros RSV F eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa.

- 50 La FPLC-SEC se llevó a cabo en un FPLC de GE Healthcare usando una columna Superdex 200 16/60 con fase móvil de Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de alto peso molecular de GE Healthcare para calibrar el sistema, los presentes inventores descubrieron que las rosetas de RSV eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de RSV eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 140-160 kDa y los monómeros de RSV F eluyen con un peso molecular aparente de
- 55 aproximadamente 75-85 kDa.

Para la purificación, se usó el procedimiento FPLC-SEC y se recogieron fracciones de 1 ml.

Escisión de tripsina de construcciones Furdel o Delp23 Furdel para formar rosetas postfusión

En general, la digestión de tripsina de monómeros Delp23 Furdel se efectúa con 1:1000 de tripsina:RSV F en peso, o 10-15 unidades BAEE de tripsina por 1 mg de antígeno RSV F. En una reacción típica, se diluyó tripsina de plasma bovino (Sigma Aldrich, T8802, 10.000-15.000 unidades BAEE/mg de tripsina) a una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Se trató una solución de 1 mg/ml de polipéptido de ectodominio de RSV F (diluida en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM) con un microlitro de solución de tripsina (relación final en masa 0,001:1 tripsina:RSV F o aproximadamente 10-15 unidades BAEE de tripsina por cada miligramo de RSV F) durante 1 hora a 37 °C. Típicamente, el progreso de la reacción de escisión se controló mediante gel de SDS-PAGE. La reacción de escisión se detuvo usando un inhibidor de tripsina. La proteína RSV F escindida se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Según la ocasión, se añadió un volumen 1:100 de inhibidor de tripsina inmovilizado (Sigma) o 1 microlitro de inhibidor de tripsina de soja 1 mM a la solución de escisión y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-30 minutos con mecido suave para detener la reacción de tripsina. La resina inhibidora se separó de la solución de proteína usando columnas de microcentrifugación. La solución resultante se purificó mediante purificación SEC.

Microscopía electrónica (EM) de proteínas RSV F.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F (aproximadamente 50 microgramos por ml), se absorbieron sobre rejillas sin brillo recubiertas con carbono y se tiñeron negativamente con fosfotungstato de sodio al 2 % (pH 7,0) y formato de uranilo al 0,75 % (bajo pH no cuantificado). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Technai Spirit o JOEL 1230 operando a entre 80-120 kV con un aumento entre 20.000 y 150.000 dependiendo de la resolución necesaria.

Ensayo de fosfolípido

Este ensayo se basa en el ensayo de colina oxidasa de Fosfolípidos C - procedimiento DAOS de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (n.º de cat 433-36201). El protocolo de ensayo se modifica únicamente para reducir la cantidad de material usado en el ensayo, y para reducir la dilución de la muestra en la reacción en relación al protocolo general del vendedor. Para determinar el contenido de lípido de la muestra de RSV F, se genera el reactivo de color disolviendo un bote de reactivo de color con un bote de tampón (el reactivo de color es estable durante 1 semana a 4 °C). Se diluye el patrón de fosfolípido 300 mg/dl (3 mg/ml) a 1,5, 1,0, 0,75, 0,5 y 0,25 mg/ml con agua destilada. Para cada patrón, un blanco de agua y muestra de reacción, se añaden a un tubo de microcentrifugación 10 µl de reactivo de color y 2 µl bien de patrón, agua destilada (patrón de 0 mg/ml) o muestra. Las reacciones se centrifugan brevemente para asegurar un mezclado adecuado y se incuban los tubos durante 15 min a 37 °C. Se registra la absorbancia a 595 nm para cada punto patrón y se genera una curva patrón. Se registra la absorbancia a 595 nm para cada muestra y se calcula la concentración de fosfolípidos a partir de la curva de calibración preparada.

Inmunogenicidad en ratas del algodón

La inmunogenicidad de los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F en las formas de monómeros (delp21 furx no escindido), rosetas de trímeros (delp23 furdel escindidos), y trímeros (eliminación de péptido de fusión) se determinaron en ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*) en dos estudios. En el estudio 1 (FIG. 8A y 8B), se vacunaron por vía intramuscular 10 ratas del algodón con 10 mg de monómeros o rosetas (cada uno adsorbido en hidróxido de aluminio) en los días 0 y 21. Se midieron los títulos en suero de IgG anti-proteína RSV F y de anticuerpo neutralizante de RSV 2 semanas después de la 1ª vacunación (2sd1) y 2 semanas después de la 2ª vacunación (2sd2), o 3 semanas después de la 1ª vacunación (3sd1) y 2 semanas después de la 2ª vacunación (2sd2). La IgG anti-proteína RSV F (figura 8A) se determinó mediante ELISA usando placas recubiertas de proteína RSV F y anticuerpo de detección anti-IgG de rata del algodón conjugado a peroxidasa de rábano picante. Los datos se presentan como log₁₀ de la media geométrica de los títulos (GMT) + desviaciones estándar de ratas del algodón individuales. Los títulos de neutralización de RSV (FIG. 8B) se midieron mediante una prueba de neutralización de reducción en placa (PRNT). En resumen, se preincubaron diluciones de suero inactivado por calor con RSV largo, y después se inocularon en células HEP-2 en placas de 12 pocillos. Después de una infección de 2 horas, se retiró el inóculo y se recubrieron las células con agarosa. Las placas se enumeraron 5 días después mediante tinción de rojo neutro. El título de neutralización se define como la función recíproca de la dilución de suero que produce una reducción de al menos el 60 % en el número de placas por pocillo, en relación a los controles (sin suero). Los datos se presentan como log₁₀ GMT + error estándar de 2 grupos de 5 ratas del algodón por grupo.

En el estudio 2 (FIG. 8C), se inmunizaron por vía intramuscular 9 ratas del algodón por grupo con las dosis indicadas de monómeros, trímeros, o rosetas (cada una adsorbida a hidróxido de aluminio). Los títulos de suero anti-IgG de proteína RSV F se midieron 2sd1, como en el caso anterior.

Resultados

5 Se expresó el ectodominio de RSV F soluble (con sitios de escisión de furina no mutados), pero no pudo purificarse de impurezas de lípidos y lipoproteínas procedentes de las células hospedadoras o medios de cultivo usando cromatografía de exclusión por tamaño. Estos polipéptidos de ectodominio de RSV F eluyen en el volumen vacío de la columna de SEC junto con los contaminantes de lípidos y lipoproteína.

10 Se prepararon varias construcciones para producir polipéptidos de ectodominio de RSV F que contienen mutaciones para los sitios de escisión de furina, incluyendo las construcciones Furdel. Véase La FIG. 1. Los polipéptidos producidos mediante la expresión de construcciones Furdel se secretaron de las células en forma de una especie de ~65 kDa no escindida. La mutación Furdel también previene la exposición del péptido de fusión, que a su vez previene la formación de rosetas. Como resultado, RSV F Furdel soluble migró en el volumen incluido de una columna preparatoria Superdex 200, dando como resultado la separación tanto de los restos lipídicos, que eluyeron en el volumen vacío, como de impurezas de proteína de insecto. Estos resultados demuestran que los polipéptidos de RSV F en los que se han mutado los sitios de escisión de furina se producen en forma de polipéptido no escindido que puede purificarse mediante SEC. Además, el análisis del tiempo de retención de RSV F no escindido fue coherente con que los polipéptidos fuesen monómeros en lugar de trímeros.

15 Se evaluó además si los polipéptidos RSV F furdel eran monómeros, trímeros o una mezcla de monómeros y trímeros usando ultracentrifugación analítica. Se llevaron a cabo estudios de ultracentrifugación analítica usando proteína purificada a partir del pico de monómero a partir de la purificación SEC. Los datos de velocidad de sedimentación de RSV F no escindida mostraron un patrón escalonado, lo que sugiere dos especies en solución. El análisis del experimento de velocidad de sedimentación mostró que el ectodominio de RSV F no escindido tenía una alta población de monómero y una población menor de trímero aparente en la solución. Se recogieron los datos de ejecución de equilibrio y se llevaron a cabo intentos para ajustar los datos bien a un modelo de monómero ideal o a un modelo de equilibrio de trímero. Sin embargo, los residuos de los ajustes son malos, particularmente hacia la parte inferior de la célula, donde la concentración de proteína es mayor. Estas observaciones sugirieron que los polipéptidos de ectodominio de RSV F no escindidos son predominantemente un monómero con una población menor que se autoasocia (potencialmente en forma de trímeros) o se agrega a mayores concentraciones.

20 Se llevó a cabo un análisis adicional de polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). FIG. 6A-6D. Los picos principales que contienen monómeros, trímeros o rosetas de trímeros se indican por un asterisco en las FIG. 6A-6D, indicándose el tiempo de retención de la columna Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) en mililitros. En una columna calibrada, los tiempos de retención aproximados de 47 ml, 65 ml y 77 ml corresponden al volumen vacío de la columna, la retención de trímeros F y la retención de los monómeros, respectivamente. En la FIG. 6A, la construcción Delp23 Furdel ($\Delta p23$ Furdel) no escindida se purificó a partir del pico de monómero. Cuando se trató el antígeno Delp23 Furdel de RSV F no escindido con tripsina, la proteína formó rosetas, migraron en la SEC en el volumen vacío (FIG. 6B). La especie de trímero escindido de la eliminación de péptido de fusión de RSV F se purificaron a partir del pico de trímero a un tiempo de retención de aproximadamente 65 ml (FIG. 6C) mientras que la construcción Delp21 Furx no escindida ($\Delta p21$ Furx) se purificó a partir del pico de monómero a aproximadamente 77 ml (FIG. 6D).

30 Se evaluaron varios polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F en forma no escindida o después de la escisión de tripsina mediante EM. Las construcciones RSV Furdel y delp23 Furdel tienen restos de arginina restantes en el sitio de escisión de furina. Estas argininas son susceptibles a escisión por tripsina. Tras la escisión, las especies F₀ no escindidas se convirtieron en las especies F₁/F₂, en las que el péptido de fusión está expuesto. El análisis de EM confirmó que después de la escisión de tripsina, los ectodominios de RSV no escindidos formaron rosetas de trímeros por virtud de sus péptidos de fusión, tal como se ha observado para proteínas de fusión relacionadas. Los resultados se presentan en la tabla 3, y demuestran que los polipéptidos de ectodominio de proteína RSV F pueden escindirse para formar rosetas de trímeros. La construcción de péptido de fusión eliminado, que se escinde por furina, formó trímeros monodispersos. Véanse también las FIG. 7A-7D. Ventajosamente, la producción de rosetas de trímeros de este modo da como resultado rosetas de trímeros que están sustancialmente de restos lipídicos y lipoproteínas.

40 Los resultados de los estudios de inmunogenicidad demostraron que los polipéptidos de ectodominio de RSV F en forma de monómeros (delp21 furx no escindido), rosetas de trímeros (delp23 furdel escindido), y trímeros (eliminación de péptido de fusión) fueron inmunogénicos en ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), e indujeron anticuerpos neutralizantes. FIG. 8A-8C.

Tabla 3	
Construcción	Conformación mediante EM
Ectodominio de tipo silvestre de RSV F (escindido en la célula hospedadora durante la expresión)	Rosetas de trímeros asociadas con restos lipídicos

(continuación)

Tabla 3	
Construcción	Conformación mediante EM
Furdel escindible por tripsina (pico de monómero purificado - no escindido)	Variable. Algunas preparaciones muestran trímeros monodispersos; otras muestran poco material visible mediante EM de material teñido negativamente
Furdel escindible por tripsina (pico de monómero purificado - escindido por tripsina tras la purificación)	Rosetas de trímeros
Delp23 furdel escindible por tripsina (pico de monómero purificado - no escindido)	Variable. Algunas preparaciones muestran trímeros monodispersos; otras muestran poco material visible mediante EM de material teñido negativamente
Del23 Furdel escindible por tripsina (pico de monómero purificado - escindido por tripsina tras la purificación)	Rosetas de trímeros
Eliminación de péptido de fusión escindido (pico de monómero purificado)	Trímeros monodispersos

Ejemplo 5 - Procedimientos para preparar antígenos de subunidad F de RSV en células de insecto o CHO -

Purificación de antígeno RSV F a partir de células de insecto:

- 5 Las subunidades de ectodominio de RSV F, incluyendo Delp21 Furx, Delp23 Furdel y construcciones de eliminación de péptido de fusión, se expresaron en células de insecto HiFive (Invitrogen) usando el sistema de baculovirus pFAST Bac. La subunidad de RSV F se purificó a partir de expresiones a gran escala, 10-25 litros, mediante un procedimiento quelante en dos etapas que reducen el efecto perjudicial del contaminante de ferritina presente en el medio de células de insecto, que puede corromper la resina quelante. Se añadió CuSO_4 al sobrenadante del medio a una concentración final de 500 μM . Se añadieron aproximadamente de diez a veinte mililitros de resina quelante (resina quelante, BioRad) a cada 1 litro de medio, la lechada se mecía durante al menos treinta minutos a 4 °C, y se separaron la resina y el medio usando una columna de gravedad. La resina se lavó con aproximadamente dos veces el volumen de resina de tampón de equilibrado (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM), y se eluyó el ectodominio de la proteína F con aproximadamente dos veces el volumen de columna de tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 250 mM). La elución se dializó contra tampón His 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM y la solución resultante se cargó en una columna de quelación HiTrap de 5 ml cargada con NiSO_4 (GE Healthcare). La proteína unida se eluyó con Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Las eluciones del gradiente de imidazol en ambos casos se evaluaron usando transferencias de Western anti-HIS₆ y/o geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Las fracciones que contenían construcciones puras se recogieron y concentraron a aproximadamente 1 mg/ml usando concentradores Centriprep de Millipore y/o unidades de concentración Vivaspin para el posterior análisis/purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Análisis SEC y purificación de ectodominios de RSV F

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para purificar y analizar monómeros no escindidos y trímeros escindidos de ectodominio de proteína RSV F. Este procedimiento también permitió que se purificasen ectodominios de proteína RSV F no escindida de células hospedadoras o lípidos y lipoproteínas contaminantes procedentes del medio. En el caso de generación de rosetas puras, se purificó la construcción Delp23 Furdel no escindida inicialmente en forma de un monómero y posteriormente se trató con proteasa y se volvió a purificar usando SEC para purificar rosetas homogéneas (véase más adelante). Se desarrollaron dos procedimientos para el análisis de oligomerización de RSV F, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también puede servir como una etapa de purificación eficaz.

La HPLC-SEC se llevó a cabo usando una columna de SEC de BioRad (18 mm) con una fase móvil de Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de HPLC-SEC de Biorad para calibrar el sistema, los presentes inventores descubrieron que las rosetas de RSV (que representan conformaciones escindidas post-fusión) eluyen en el volumen vacío de columna del análisis mientras que los monómeros de RSV F eluyen con un peso molecular aparente de 75-85 kDa.

La FPLC-SEC se llevó a cabo en un FPLC de GE Healthcare usando una columna Superdex 200 16/60 con fase móvil de Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de alto peso molecular de GE Healthcare para calibrar el sistema, los presentes inventores descubrieron que las rosetas de RSV eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de RSV eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 140-160 kDa y los monómeros de RSV F eluyen con un peso molecular aparente de

aproximadamente 75-85 kDa. Para la purificación de Delp21 Furx no escindido o Delp23 Furdel (monómeros) o eliminación de péptido de fusión (trímero) de RSV se cargaron 0,5-2 ml de aproximadamente 1 mg/ml de material purificado por quelación en una columna Superdex P200 16/60 equilibrada con una caudal entre 0,5-2 ml/min y se recogieron las fracciones relevantes.

5 **Escisión de tripsina de construcciones Delp23 Furdel para formar rosetas postfusión**

Se diluyó tripsina de plasma bovino (Sigma Aldrich, T8802, 10.000-15.000 unidades BAEE/mg de tripsina) a una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM. Se trató una solución de 1 mg/ml de polipéptido de ectodominio de RSV F (diluida en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM) con un microlitro de solución de tripsina (relación final en masa 0,001:1 tripsina:RSV F o aproximadamente 10-15 unidades BAEE de tripsina por cada miligramo de RSV F) durante 1 hora a 37 °C. El progreso de la reacción de escisión se controló mediante gel de SDS-PAGE. La reacción de escisión se detuvo usando un inhibidor de tripsina (Inhibidor de alubia de soja Gibco usando masas iguales de inhibidor a tripsina). Se descubrió que se necesitaba un periodo de incubación entre la etapa de escisión y la posterior purificación de rosetas para permitir una mayor eficacia de conversión de monómero a roseta. Se dio un periodo de incubación de 6 horas a 37 °C para proporcionar mayor eficacia de formación de rosetas. La proteína RSV F se purificó adicionalmente a partir de especies de monómero no convertidas usando cromatografía de exclusión por tamaño (tal como se describe anteriormente) donde pueden recogerse rosetas homogéneas en las fracciones de volumen vacío de la columna.

Purificación de antígeno RSV F a partir de células CHO:

Las construcciones de eliminación de péptido de fusión RSV F, que no contienen un marcador HIS, se purificaron mediante purificación catiónica. El material de CHO que contenía antígeno de trímero de RSV F expresado a aproximadamente una décima parte del volumen original en un sistema de concentración de cartucho de fibra hueca de GE Healthcare (PMCO 10.000 kDa). Entonces se intercambié el tampón de la solución concentrada cuatro veces con un volumen equivalente de acetato de sodio 25 mM, pH 6,0, NaCl 25 mM. La solución resultante, que contenía trímero RSV F en el tampón acetato/suero salino, se cargó en una columna HiTrap CM de GE Healthcare precargada que se había equilibrado con tampón acetato/suero salino. La proteína se eluyó de la columna usando un gradiente escalonado de tampón acetato 25 mM que contenía 25, 150, 250, 500 o 1000 mM de NaCl (conteniendo las fracciones de NaCl 250 mM y 500 mM la mayoría del material eluido). Este material pudo purificarse adicionalmente usando una purificación SEC similar al protocolo anterior.

Ejemplo 6 - Inmunogenicidad de subunidades de RSV F en ratas del algodón

La inmunidad y capacidad protectora de las subunidades de trímero (RSV-F-péptido de fusión-eliminación-trunc) la roseta (RSV-F-delp23-furdel-trunc, escindido) de RSV F, cada una formulada con alumbre o MF59, se evaluó en el modelo de rata del algodón. El antígeno usado para el ELISA en este estudio fue RSV-F-fusión-péptido de eliminación-trunc (tabla 4). La neutralización fue contra RSV infeccioso, cepa larga (tabla 5). Todas las combinaciones fueron inmunogénicas, provocando altos títulos de IgG específica de RSV F y respuestas de anticuerpo neutralizantes de RSV que se reforzaron mediante una segunda vacunación, y se proporcionó protección frente a exposición nasal a RSV.

Procedimientos

Vacunación y exposición de ratas del algodón

Se obtuvieron ratas del algodón hembra (*Sigmodon hispidis*) de Harlan Laboratories. Se inmunizaron los grupos de animales por vía intramuscular (i.m., 100 µl) con las vacunas indicadas en los días 0 y 21. Se recogieron muestras de suero 3 semanas después de la primera inmunización (3sd1) y 2 semanas después de la segunda inmunización (2sd2). Los animales inmunizados o de control sin vacunar se expusieron por vía intranasal (i.n.) a 1×10^5 ufp de RSV Largo 4 semanas después de la inmunización final. La recogida de sangre y la exposición a RSV se llevaron a cabo con anestesia con isoflurano al 3 % usando un vaporizador de precisión.

ELISA específico de RSV F

Se ensayaron muestras de suero individuales respecto de la presencia de IgG específica de RSV F mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las placas de ELISA (MaxiSorp de 96 pocillos, Nunc) se recubrieron durante toda la noche a 4 °C con 1 µg/ml de RSV F purificado (péptido de fusión eliminación-trunc) en PBS. Después de lavar (PBS con Tween 20 al 0,1 %), las placas se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1,5 horas a 37 °C. Entonces se lavaron las placas, se añadieron diluciones en serie de suero en diluyente de ensayo (PBS con Tween 20 al 0,1 % y suero de cabra al 5 %) de ratas experimentales o de control, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar, las placas se incubaron con IgG de pollo anti-rata del algodón conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluido a 1:5.000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se lavaron las placas y se añadieron 100 µl de solución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) a cada pocillo. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de H₃PO₄ 1 M, y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas. Para cada muestra de suero, se generó una gráfica de

densidad óptica (DO) frente al logaritmo de la función recíproca de dilución de suero mediante regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución de suero recíproca a una DO de aproximadamente 0,5 (normalizada a un patrón, sueros agrupados de ratas del algodón infectadas por RSV con un título definido de 1:2500, que se incluyó en cada placa).

5 Ensayo de microneutralización

Las muestras de suero se ensayaron respecto de la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante ensayo de microneutralización. Se añadieron diluciones en serie de dos veces de suero inactivado por calor (HI) (en PBS, con suero bovino fetal HI (FBS) al 5 %) a un volumen igual de RSV, cepa larga, titulado previamente para dar aproximadamente 115 UFP/25 µl. Las mezclas de suero/virus se incubaron durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %, para permitir que sucediese la neutralización del virus, y después 25 µl de esta mezcla (que contenían aproximadamente 115 UFP) se inocularon en pocillos duplicados de células HEp-2 en placas de 96 pocillos. Después de 2 h a 37 °C y CO₂ al 5 %, se recubrieron las células con metilcelulosa al 0,75 %/HI-FBS al 5 % EMEM y se incubaron durante 42 horas. Se determinó el número de partículas infecciosas del virus mediante la detección de la formación de sincitios mediante inmunotinción seguido de recuento automático. El título de neutralización se define como la función recíproca de la dilución de suero que produce una reducción de al menos el 60 % en el número de sincitios por pocillo, en relación a los controles (sin suero).

Carga viral

Se determinó la carga viral en el pulmón mediante ensayo en placa. Específicamente, se recogieron los pulmones 5 días después de la infección por RSV y se colocó un lóbulo derecho en 2,5 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con sacarosa al 25 % y se rompió con un homogenizador de tejidos. Los sobrenadantes sin células de estas muestras se almacenaron a -80 °C. Para ensayar respecto de virus infecciosos, se inocularon diluciones de homogenizado de pulmón aclaradas (en PBS con HI-FBS al 5 %) en monocapas de células HEp-2 confluentes en un volumen de 200 µl/pocillo de una placa de 12 pocillos. Después de 2 horas con agitación suave periódica (37 °C, CO₂ al 5 %), se retiró el inóculo, y se recubrieron las células con 1,5 ml de agarosa SeaPlaque (Lonza) al 1,25 % en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Lonza) suplementado con HI-FBS al 5 %, glutamina, y antibióticos. Después de 3-4 días de incubación, se recubrieron de nuevo las células con 1 ml de agarosa al 1,25 % en EMEM (Sigma) que contenía rojo neutro (Sigma) al 0,1 %. Las placas se contaron un día después con la ayuda de una caja de luz.

Un procedimiento alternativo para determinar la carga viral es la PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). La carga viral puede determinarse mediante qRT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos específicos para el gen de RSV F tal como se describe (I. Borg y col., Eur Respir J 2003; 21:944-51) con algunas modificaciones. Brevemente, se aísla ARN de 140 µl de homogenizado de pulmón aclarado, o a partir de un número conocido de unidades formadoras de placas (UFP) de RSV (determinado mediante ensayo de placa, y diluida en homogenizado de pulmón de animales no infectados), usando el kit RNeasy (Qiagen) con un volumen de elución final de 100 µl de H₂O. La síntesis de ADNc y la PCR se llevó a cabo en un solo tubo usando el kit de RT-PCR cuantitativa SuperScript III Platinum One-Step (Invitrogen) con 5 µl de ARN eluido, 10 µM de cada cebador, y 50 µM de la sonda (cebadores y sondas de Integrated DNA Technologies). Cebador directo: TTGGATCTGCAATCGCCA (SEC ID N°: 72). Cebador reverso: CTTTGTGATCTT- GTTCACTTCTCCTTCT (SEC ID N°: 73). Sonda: 5'-carboxifluoresceína (FAM)-TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCT- GCACCT-tetrametilcarboxiroadamina(TAMRA)-3' (SEC ID N°: 74). La amplificación y la detección se lleva a cabo con un dispositivo ABI Prism 7900HT o 7500 (Applied Biosystems). Se define un valor de ciclo umbral (CT) para cada muestra como el número del ciclo en el que la señal fluorescente se hace detectable por primera vez por encima de un umbral predeterminado. Las UFP equivalentes para cada muestra se determinan después basándose en una curva patrón de Ct frente al logaritmo del número de copias definido del ARN vírico.

45 **Resultados**

Se ha usado extensivamente la rata del algodón como modelo en el estudio de la patogénesis e inmunidad del RSV debido a las diversas similitudes entre la enfermedad inducida por RSV en ratas del algodón y en seres humanos. Dos paralelas importantes son la eficacia de los anticuerpos neutralizantes, y la histopatología pulmonar potenciada asociada con la vacunación de RSV inactivado con formalina. Las ratas del algodón también son más susceptibles a la infección por RSV que otros animales pequeños, tales como los ratones.

Para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas de subunidad de RSV F de los presentes inventores, se vacunó por vía intramuscular a grupos de ratas del algodón hembra con diversas dosis de trómeros (RSV-F-eliminación de péptido de fusión-trunc) o rosetas (RSV-F-delp23-furdel-trunc, escindido), cada una formulada bien con alumbre o con MF59. En todos los casos, una sola inmunización fue suficiente para inducir anticuerpos tanto específicos de F como neutralizantes en el suero cuando se midió tres semanas después de la primera vacunación (3sd1). Se administró a todas las ratas del algodón una inmunización de refuerzo homóloga tres semanas después de la primera, y esto dio como resultado un aumento significativo en las IgG específicas de F y de anticuerpos neutralizantes cuando se midió dos semanas después (2sd2). En general, la inmunogenicidad de las rosetas fue igual o mayor que la de los trómeros, la formulación MF59 potenció los títulos más que la formulación de alumbre, y

dosis más altas de proteína produjeron títulos más altos, aunque hubo algunas excepciones.

Para determinar la capacidad protectora de las vacunas de subunidad, se infectó a todas las ratas cuatro semanas después de la segunda vacunación con RSV a través de la ruta nasal y se midió la carga vírica en el pulmón cinco días después mediante ensayo de placa. En todos los casos, la vacunación de subunidad confirió protección frente a la exposición, ya que las cargas virales pulmonares en las ratas del algodón vacunadas fueron menores en más de tres órdenes de magnitud que en las los animales de control no inmunizados pero expuestos.

5

Tabla 4: Títulos de IgG en suero específicas de F

Suero recogido	Dosis de proteína (µg)	Título de IgG en suero específica de F ^a			
		alumbre		MF59	
		trímero	roseta	trímero	roseta
3wp1	10	20276	36841	10251	22415
	1	18341	20802	3712	28610
	0,1	2698	6896	1065	8293
2wp2	10	103670	97174	130016	156144
	1	142331	102405	177441	299501
	0,1	11581	34354	50238	111099

^a media aritmética del título para ratas del algodón individuales (7-8 por grupo) el inmunógeno de trímero fue RSV-F-eliminación de péptido de fusión-trunc el inmunógeno de roseta fue RSV-F-delp23-furdel-trun, escindido.

Tabla 4A: Título viral en pulmón 5 días después de exposición a RSV^a

vacunación	Dosis de proteína (µg)	título de virus ^b
Ninguno	-	822760
trímero/alumbre	10	546
	1	636
	0,1	903
roseta/alumbre	10	305
	1	341
	0,1	548
trímero/MF59	10	360
	1	301
	0,1	456
roseta/MF59	10	244
	1	257
	0,1	716

^aexposición intranasal con 1×10^5 unidades formadoras de placa (ufp) de RSV largo

^b ufp/g en pulmón 5 días después de exposición

Media geométrica de títulos de 7-8 ratas del algodón individuales/grupo.

Si un animal individual tenía un título de <203 (límite de detección) se le asignó un título de 100.

10

Tabla 5: Título de suero de neutralización de RSV

Suero recogido	Dosis de proteína (µg)	Título de suero de neutralización de RSV ^a			
		alumbre		MF59	
		trímero	roseta	trímero	roseta
3wp1	10	628	1050	578	229
	1	208	633	165	205
	0,1	57	200	51	65
2wp2	10	3669	4015	3983	3436
	1	3369	2844	5728	3940
	0,1	744	1902	2414	2093

^a título de neutralización de reducción de sincitios al 60 %

media geométrica del título para dos agrupaciones de 3-4 ratas del algodón por grupo

Ejemplo 7 - Vacuna de ARN de RSV**Síntesis de ARN**

El ADN de plásmido que codificada el replicón de alfavirus (FIG. 4, SEC ID N°: 77) sirvió como molde para la síntesis de ARN *in vitro*. Para estos experimentos, se usó la glucoproteína de fusión de la superficie de longitud completa de RSV (RSV F) (FIG. 4). Tras la administración del replicón a células eucariotas, el ARN de hebra positiva se tradujo para producir cuatro proteínas no estructurales, que juntas replicaron el ARN genómico y transcribieron abundantes ARNm subgenómicos que codificaban el producto génico heterólogo. Debido a la ausencia de expresión de las proteínas estructurales de alfavirus, los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) cadena arriba del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del ARN de replicón *in vitro* y la ribozima del virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente cadena abajo de la cola de poli(A) genera el extremo 3' correcto mediante su actividad de autoescisión.

Después de la linearización del ADN de plásmido cadena abajo de la ribozima de VHD con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron los transcritos ejecutados *in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN procedente de bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se llevaron a cabo durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM (ARN polimerasa de SP6) de cada uno de los nucleósido trifosfatos (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion, Austin, TX). Después de la transcripción, se digirió el ADN molde con TURBO DNasa (Ambion, Austin, TX). El ARN de replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. El ARN desprotegido se protegió postranscripcionalmente con enzima protectora de Vaccinia (VCE) usando el sistema de protección ScripCap m'G (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) tal como se indica en el manual del usuario. El ARN protegido postraduccionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la densidad óptica a 260 nm. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante.

Formulación de nanopartículas lipídicas (liposomas) RV01(01)

Se sintetizó 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DlinDMA) usando un procedimiento descrito previamente [Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 107: 276-287 (2005)]. Se adquirió 1,2-diastearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DSPC) a través de Genzyme. Se obtuvo colesterol a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio) (PEG DMG 2000), 1, 2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio) se obtuvo a través de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Se prepararon soluciones madre recientes de lípido en etanol. 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG DMG 2000 se pesaron y disolvieron en 7,55 ml de etanol. La solución madre de lípido recién preparada se meció suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Después, se añadieron 755 µl de la solución madre a 1,245 ml de etanol para producir una solución madre de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípido se usó para formar LNP con 250 µg de ARN a una relación 8:1 N:P (nitrógeno a fosfato). El nitrógeno protonable en DlinDMA (el lípido catiónico) y los fosfatos en el ARN se usan para este cálculo. Cada µg de moléculas de ARN autorreplicante se asumió que contenía 3 nmol de fosfato aniónico, cada µg de DlinDMA se asumió que contenía 1,6 nmol de nitrógeno catiónico. También se preparó una solución de trabajo de 2 ml de ARN a partir de una solución madre de ~1 µg/ml en tampón citrato 100 mM (pH 6) (Teknova, Hollister, CA). Se enjuagaron tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con solución RNasa Away (Molecular BioProducts, San Diego, CA) y se lavaron con cantidad de sobra de agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales de RNAsas. Uno de los viales se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípido y ARN (tal como se describe a continuación). Las soluciones de trabajo de lípido y ARN se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarse en jeringas de tipo luer-loc de 3 cc (BD Medical, Franklin Lakes, NJ). Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Se conectaron las jeringas que contenían ARN y los lípidos a un mezclador T (PEEK™, DI de la unión 500 µm, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA) usando tubos de FEP ([etileno-propileno fluorado] DI de 2mm x DE de 3mm, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA). La salida del mezclador T también fue un tubo de FEP (DI 2 mm x 3 mm). La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un tramo de tubo separado (DI 2 mm x DE 3 mm). Todas las jeringas se accionaron al mismo tiempo a un caudal de 7 ml/min usando una bomba de jeringas (kdScientific, n.º de modelo KDS-220, Holliston, MA). Las salidas del tubo se situaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). Se extrajo la barra de agitación y se dejó equilibrar la solución de etanol/acuosa a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringuilla de 5 cc (BD Medical), que se conectó a un trozo de tubo de FEP (DI 2 mm x DE 3 mm, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA) y en otra jeringa de 5 cc conectada a un tramo de tubo de FEP de igual longitud, se cargó una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a un caudal de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y se recogió el volumen final en un vial de vidrio de 20 ml (con agitación). A continuación, la mezcla recogida de la segunda etapa de mezclado (liposomas) se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une a y retira moléculas aniónicas, obtenida de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Antes de hacer pasar los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6) a

través de la membrana Mustang. Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes de hacerlos pasar a través del filtro Mustang. A continuación, se concentraron los liposomas a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de PBS 1X (de Teknova) usando el sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) antes de recuperar el producto final. El sistema TFF y las membranas de filtración de fibra hueca se compraron a través de Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA) y se usaron de acuerdo con las orientaciones del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona (número de pieza P/N: X1AB-100-20P) con un corte de tamaño de poro de 100 kD y un área superficial de 8 cm². Para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN requerida con PBS 1X (de Teknova).

Procedimiento para preparar la emulsión catiónica 17 (CNE17)

Se obtuvieron escualeno, trioleato de sorbitán (Span 85) y monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) a través de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Se adquirió 1,2-dioleoil-2-trimetilamonio-propano (DOTAP) a través de Lipoid (Ludwigshafen, Alemania). Las nanoemulsiones catiónicas (CNE) se prepararon de manera similar a las de MF59 cargadas, tal como se ha descrito anteriormente con modificaciones menores, Ott, y col., *Journal of Controlled Release*, 79(1-3): 1 -5 (2002)). Brevemente, los componentes liposolubles (es decir, escualeno, span 85, lípidos catiónicos, tensioactivos lipídicos) se combinaron en un vaso de precipitados, los componentes lipídicos se disolvieron en cloroformo (CHCl₃) o en diclorometano (DCM). La solución de lípido resultante se añadió directamente al aceite más span 85. Se dejó que se evaporase el disolvente a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana de humos antes de combinar la fase acuosa y homogenizar la muestra usando un homogenizador IKA T25 a 24K RPM para proporcionar una solución madre de alimentación homogénea. Se hicieron pasar las emulsiones primarias de tres a cinco veces a través de un homogenizador Microfluidizer M110S o M110PS con un serpentín de refrigeración con baño de hielo a una presión de homogenización de aproximadamente 103421 - 137895 kPa (Microfluidics, Newton, MA). Las muestras por lotes de 20 ml se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4 °C. La tabla a continuación describe la composición de CNE 17.

Tabla 6: Composición de CNE 17

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml +lípido	Tensioactivo	Escualeno	Tampón/agua
CNE17	DOTAP (en DCM)	1,40	SPAN 85 al 0,5 % Tween 80 al 0,5 %	4,3 %	tampón citrato 10 mM, pH 6,5

Formación de complejos de ARN

Se calculó el número de nitrógenos en solución a partir de la concentración de lípido catiónico, DOTAP, por ejemplo, tiene 1 nitrógeno que puede protonarse por molécula. La concentración de ARN se usó para calcular la cantidad de fosfato en la solución usando una estimación de 3 nmol de fosfato por microgramo de ARN. Al variar la cantidad de ARN: lípido, puede modificarse la relación N/P. Se formaron complejos de ARN con CNE 17 a relaciones de nitrógeno / fosfato (N/P) de 10:1. Usando estos valores, el ARN se diluyó a la concentración adecuada en agua libre de RNAsa y se añadió directamente un volumen igual de emulsión mientras se agitaba vorticalmente con suavidad. Se dejó asentar la solución a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Una vez formado el complejo, la solución resultante se diluyó a la concentración requerida antes de su administración.

Electroporación

La electroporación fue un procedimiento muy eficaz para la administración de vacunas de pDNA y esta técnica se usó para administrar ARN autorreplicante. Se anestesió con isoflurano a ratones, se les afeitó las patas traseras para exponer la zona de la extremidad que se iba a tratar. Se inyectó una dosis de 30 µl de vacuna en el músculo de la pantorrilla de la extremidad trasera usando una jeringuilla de insulina de 1/2 cc. Se electroporó el músculo usando el sistema de administración de ADN Elgen® (Inovio, San Diego). Los parámetros del instrumento son los siguientes: 60V, 2 pulsos cada uno a 60 ml. Se administró otra dosis de manera similar a la otra extremidad, seguido de electroporación.

Partículas virales de replicón (VRP)

Para comparar las vacunas de ARN con las estrategias de vector de ARN tradicionales para lograr la expresión *in vivo* de genes o antígenos indicadores, se utilizaron partículas virales de replicón (VRP) producidas en células BHK mediante los procedimientos descritos en Perri y col. En este sistema, los replicones del antígeno (o del gen indicador) consistían en replicones quiméricos de alfavirus (VCR) procedentes del genoma del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) modificados por ingeniería genética para que contuviesen las secuencias terminales 3' (3' UTR) del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS) del virus Sindbis (véase la fig. 2 de Perri y col.). Estos replicones se empaquetaron en VRP electroporándolos conjuntamente con células de riñón de cría de hámster (BHK) junto con ARN auxiliares defectuosos que codifican los genes de la cápsida y glucoproteína del virus Sindbis (véase la fig. 2 de Perri y col.). Entonces se recogieron las VRP y se titularon mediante procedimientos convencionales y se inocularon en animales en fluido de cultivo u otros tampones isotónicos. Perri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, Romero RE, Tang Z, Bin Q, Dubensky TW, Jr. y col (2003) An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine

delivery vector. J Virol 77: 10394-10403

Vacuna de subunidad de trímero de RSV F

El trímero de RSV F es una proteína recombinante que comprende el ectodominio de RSV F con una eliminación de la región de péptido de fusión previniendo su asociación con otros trímeros. La construcción resultante forma un trímero homogéneo, tal como se observa mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y tiene un fenotipo esperado coherente con una conformación post-fusión de F, tal como se observa mediante microscopía electrónica. La proteína se expresó en células de insecto y se purificó por virtud de un marcador HIS fusionado con el extremo C-terminal de la construcción seguido por cromatografía de exclusión por tamaño usando técnicas convencionales. La muestra de proteína resultante muestra una pureza mayor del 95 %. Para la evaluación *in vivo* de la vacuna de subunidad F, se adsorbieron 100 µg/ml de trímero de proteína en 2 mg/ml de alumbre usando tampón de histidina 10 mM, pH 6,3 y se ajustó la isotonicidad con cloruro de sodio a 150 mM. La proteína de subunidad F se adsorbió en alumbre durante toda la noche con agitación suave a 2-8 °C. El pH y la osmolalidad de la vacuna final se ajustaron a 6,5-7,5 y 240-360 mOsm/kg. La vacuna se caracterizó respecto de la adsorción de proteína mediante SDS-PAGE (Invitrogen Corporation, EE.UU.) y respecto del contenido de endotoxina mediante ensayo LAL (Charles River Laboratories, EE.UU.). La vacuna se mezcló mediante inversión cuidadosa antes de la inmunización.

Estudios de inmunogenicidad murinos

Se inmunizó a grupos de 10 ratones BALB/c hembra de 8-10 semanas de edad y con pesos aproximados de 20 gramos en el día 0 y en el día 21, extrayéndose muestras de sangre en los días 14, 35 y 49. Se inyectó a todos los animales en el cuádriceps de las dos patas traseras recibiendo cada uno un volumen equivalente (50 µl por sitio) hasta un total de 100 µl de vacuna para administrar una dosis de 10 µg de antígeno. Cuando fue necesario medir las respuestas de linfocitos T, se recogieron los bazos en el día 35 o 49.

Vacunación y exposición de ratas del algodón

Se obtuvieron ratas del algodón hembra (*Sigmodon hispidis*) de Harlan Laboratories. Todos los experimentos fueron aprobados y llevados a cabo de acuerdo con el Comité de Cuidado y Uso Animal de Novartis. Se inmunizaron los grupos de animales por vía intramuscular (i.m., 100 µl) con las vacunas indicadas en los días 0 y 21. Se recogieron muestras de suero 2 semanas después de cada inmunización. Los animales inmunizados o de control sin vacunar se expusieron por vía intranasal (i.n.) a 1×10^5 UFP de RSV 4 semanas después de la inmunización final. La recogida de sangre y la exposición a RSV se llevaron a cabo con anestesia con isoflurano al 3 % usando un vaporizador de precisión.

Ensayos de función de linfocitos T de ratón

Ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares

Se agruparon de dos a cinco bazos de ratones BALB/c vacunados de la misma forma y se prepararon suspensiones de células individuales para su cultivo. Se establecieron dos cultivos estimulados por antígeno y dos cultivos no estimulados para cada grupo de esplenocitos. Los cultivos estimulados con antígeno contenían 1×10^6 esplenocitos, péptido RSV F 85-93 (1×10^{-6} M), péptido RSV F 249-258 (1×10^{-6} M), péptido RSV F 51-66 (1×10^{-6} M), Acm anti-CD28 (1 µg/ml), y brefeldin A (1:1000). Los cultivos no estimulados no contenían péptidos de RSV F, y por lo demás fueron idénticos a los cultivos estimulados. Después de cultivar durante 6 horas a 37 °C, se procesaron los cultivos para inmunofluorescencia. Las células se lavaron y después se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 marcados fluorescentemente (Acm). Las células se lavaron de nuevo y después se fijaron con Cytfix/Cytoperm durante 20 minutos. Las células fijadas se lavaron a continuación con tampón Perm-Wash y después se tiñeron con Acm marcados fluorescentemente específicos para IFN-γ, TNF-α, IL-2, y IL-5. Las células teñidas se lavaron y después se analizaron en un citómetro de flujo LSR II. Se usó el programa informático FlowJo para analizar los datos adquiridos. Los subconjuntos de linfocitos T CD4+/- y CD8+4- se analizaron por separado. Para cada subconjunto en una muestra dada se determinó el % de células positivas a citocinas. Se calculó el % de linfocitos T específicos de antígeno de RSV F como la diferencia entre el % de células positivas a citocinas en los cultivos estimulados con antígeno y el % de células positivas a citocinas en los cultivos no estimulados. Los límites de confianza del 95 % para el % de células específicas de antígeno se determinaron usando procedimientos estándar (Statistical Methods, 7ª Edición, G.W. Snedecor y W.G. Cochran).

Ensayo de citocinas secretadas

Los cultivos para el ensayo de citocinas secretadas fueron similares a aquellos para el ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares excepto en que se omitió la Brefeldina A. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo después de un cultivo durante toda la noche a 37 °C, y se analizaron respecto de múltiples citocinas usando kits de Th1/TH2 de ratón de Meso Scale Discovery. La cantidad de cada citocina por cultivo se determinó a partir de curvas patrón producidas usando citocinas purificadas recombinantes suministradas por el fabricante.

ELISA específico de RSV F

Se ensayaron muestras de suero individuales respecto de la presencia de IgG específica de RSV F mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las placas de ELISA (MaxiSorp de 96 pocillos, Nunc) se recubrieron durante toda la noche a 4 °C con 1 µg/ml de RSV F purificado (delp23-furdel-trunc no escindido) en PBS. Después de lavar (PBS con Tween 20 al 0,1 %), las placas se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1,5 horas a 37 °C. Entonces se lavaron las placas, se añadieron diluciones en serie de suero en diluyente de ensayo (PBS con Tween 20 al 0,1 % y suero de cabra al 5 %) de ratas experimentales o de control, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar, las placas se incubaron con IgG de pollo anti-rata del algodón conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluido a 1:5.000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se lavaron las placas y se añadieron 100 µl de solución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) a cada pocillo. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de H₃PO₄ 1 M, y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas. Para cada muestra de suero, se generó una gráfica de densidad óptica (DO) frente al logaritmo de la función recíproca de dilución de suero mediante regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución de suero recíproca a una DO de aproximadamente 0,5 (normalizada a un patrón, sueros agrupados de ratas del algodón infectadas por RSV con un título definido de 1:2500, que se incluyó en cada placa).

Ensayo de microneutralización

Las muestras de suero se ensayaron respecto de la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante ensayo neutralización de reducción de placas (PRNT). Se añadieron diluciones en serie de factor dos de suero HI (en PBS con HI-FBS al 5 %) a un volumen igual de RSV largo titulado previamente para dar aproximadamente 115 UFP/25 µl. Las mezclas de suero/virus se incubaron durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %, para permitir que sucediese la neutralización del virus, y después 25 µl de esta mezcla (que contenían aproximadamente 115 UFP) se inocularon en pocillos duplicados de células HEp-2 en placas de 96 pocillos. Después de 2 h a 37 °C y CO₂ al 5 %, se recubrieron las células con metilcelulosa al 0,75 %/HI-FBS al 5 % EMEM y se incubaron durante 42 horas. Se determinó el número de partículas infecciosas del virus mediante la detección de la formación de sincitios mediante inmunotinción seguido de recuento automático. El título de neutralización se define como la función recíproca de la dilución de suero que produce una reducción de al menos el 60 % en el número de sincitios por pocillo, en relación a los controles (sin suero).

Carga viral

Se determinó la carga viral en el pulmón mediante ensayo en placa. Específicamente, se recogieron los pulmones 5 días después de la infección por RSV y se colocó un lóbulo derecho en 2,5 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con sacarosa al 25 % y se rompió con un homogenizador de tejidos. Los sobrenadantes sin células de estas muestras se almacenaron a -80 °C. Para ensayar respecto de virus infecciosos, se inocularon diluciones de homogenizado de pulmón aclaradas (en PBS con HI-FBS, suero bovino fetal inactivado por calor al 5 %) en monocapas de células HEp-2 confluentes en un volumen de 200 µl/pocillo de una placa de 12 pocillos. Después de 2 horas con agitación suave periódica (37 °C, CO₂ al 5 %), se retiró el inóculo, y se recubrieron las células con 1,5 ml de agarosa SeaPlaque (Lonza) al 1,25 % en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Lonza) suplementado con HI-FBS al 5 %, glutamina, y antibióticos. Después de 3-4 días de incubación, se recubrieron de nuevo las células con 1 ml de agarosa al 1,25 % en EMEM (Sigma) que contenía rojo neutro (Sigma) al 0,1 %. Las placas se contaron un día después con la ayuda de una caja de luz.

Patología pulmonar de ratas del algodón

Cinco días después de la exposición a RSV se recogieron los pulmones y se recogieron 4 lóbulos de cada animal y se fijaron con formalina neutra tamponada al 10 % (NBF) mediante instilación intratraqueal suave seguida de inmersión de fijación. Los tejidos se procesaron de manera rutinaria para preparar secciones teñidas con hematoxilina y eosina para su examen en el microscopio. Los hallazgos se evaluaron usando una modificación de criterios previamente publicados [Prince GA, y col., 2001] para los siguientes parámetros: prebronquiolitis, alveolitis, bronquitis, infiltrados celulares perivasculares, y neumonitis intersticial. Las lesiones se graduaron con una escala semicuantitativa de 4 puntos. Cambio mínimo (+) contenía uno o unos pocos focos pequeños; cambio leve (++) estaba compuesto de focos de tamaño de pequeño a grande; cambio moderado (+++) contenía focos frecuentes y/o de tamaño moderado; y cambio marcado (+++) mostró focos de extensos a confluentes que afectaban a la mayoría/la totalidad del tejido.

Ejemplo 7**A - Estudio de exposición a RSV en ratas del algodón (CRIS14)**

El replicón A317, que expresa la glucoproteína de fusión de superficie de RSV (RSV F) se usó para este experimento. Se administró a ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, vacunas intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con ARN autorreplicante desnudo (A317, 1 µg o 10 µg), ARN autorreplicante formulado en LNP [RV01(01), A317, 0,1 µg o 1 µg], VRP (5x10⁶ UI) que expresan RSV-F, subunidad

de trímico F/alumbre (10 µg), o vacuna de RSV inactivado por formalina (5200 FI-ufp). Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2sd1) y 35 (2sd2). Se expuso a todos los animales con 1×10^5 ufp de RSV por vía intranasal en el día 49 y se recogieron los pulmones en el día 54 (5dde) para la determinación de la carga vírica y la patología pulmonar.

5 Resultados

Tabla 7: Título de IgG en suero específica de F en los días 14 y 35

vacuna	dosis	IgG específica de F	
		2wp1	2wp2
A317	10 µg	198	1599
A317	1 µg	78	526
CNE17	1 µg	408	4918
CNE17	0,1 µg	325	2512
RV01(01)	1 µg	531	4351
RV01(01)	0,1 µg	134	1033
VRP	5x10 ⁶ UI	961	5864
Trímico de F/alumbre	10 µg	3526	111893
FI-RSV	5200 FI-ufp	17	2074
Ninguno		5	5

Tabla 7. Títulos de IgG en suero específica de F de ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2sd1) y 35 (2sd2), se expuso a todos los animales con 1×10^5 ufp de RSV por vía intranasal en el día 49. Los pulmones se recogieron en el día 54 (5dde) para la determinación de la carga vírica y de la patología pulmonar. Los datos se presentan como la media geométrica de títulos virales de 8 ratas del algodón individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 8: Títulos de neutralización de suero de RSV en los días 14 y 35

vacuna	dosis	PRNT60	
		2wp1	2wp2
A317	10 µg	78	240
A317	1 µg	58	70
CNE17	1 µg	91	269
CNE17	0,1 µg	63	145
RV01(01)	1 µg	103	667
RV01(01)	0,1 µg	46	130
VRP	5x10 ⁶ UI	149	683
Trímico de F/alumbre	10 µg	142	> 5120
FI-RSV	5200 FI-ufp	28	38
Ninguno		30	<20

Tabla 8. Títulos de neutralización de suero de RSV de ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis en los días 14 (2sd1) y 35 (2sd2). Los datos se presentan como títulos de neutralización de reducción de placa al 60 %. Media geométrica del título de 2 grupos de 4 ratas del algodón por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

10

Tabla 9: Títulos virales en pulmón 5 días después de exposición a RSV

vacuna	dosis	ufp/g pulmón 5dpc
A317	10 µg	397
A317	1 µg	659

(continuación)

vacuna	dosis	ufp/g pulmón 5dpc
CNE17	1 µg	414
CNE17	0,1 µg	572
RV01(01)	1 µg	445
RV01(01)	0,1 µg	716
VRP	5x10 ⁶ UI	359
Trímero de F/alumbre	10 µg	190
FI-RSV	5200 FI-ufp	5248
ninguno (expuesta)		728618

Tabla 9: Títulos virales en pulmón 5 días después de la exposición a RSV de ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se expuso a todos los animales con 1x10⁵ ufp de RSV por vía intranasal en el día 49. Los pulmones se recogieron en el día 54 (5dde) para la determinación de la carga vírica y de la patología pulmonar. Los datos se presentan como unidades formadoras de placa por gramo de pulmón determinadas mediante ensayo de placa. Media geométrica de títulos de 8 ratas del algodón individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <200 (límite de detección) se le asignó un título de 100.

Tabla 10: Puntuaciones de alveolitis en pulmón 5 días después de exposición a RSV

vacuna	dosis	n.º de ratas del algodón con la puntuación indicada de alveolitis				
		0	1	2	3	4
A3171	10 µg	8				
A3171	1 µg	8				
CNE17	1 µg	8				
CNE17	0,1 µg	7	1			
RV01(01)	1 µg	6	2			
RV01(01)	0,1 µg	8				
VRP	5x10 ⁶ UI	3	4	1		
Trímero de F/alumbre	10 µg	7	1			
FI-RSV	5200 FI-ufp	1	4	3		
ninguno (expuesta)		5	3			

Tabla 10. Alveolitis en pulmón 5 días después de la exposición a RSV de ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se expuso a todos los animales con 1x10⁵ ufp de RSV por vía intranasal en el día 49. Los pulmones se recogieron en el día 54 (5dde) para la determinación de la carga vírica y de la patología pulmonar. Las lesiones se graduaron con una escala semicuantitativa de 4 puntos. Cambio mínimo (1) contenía uno o unos pocos focos pequeños; cambio leve (2) estaba compuesto de focos de tamaño de pequeño a grande; cambio moderado (3) contenía focos frecuentes y/o de tamaño moderado; y cambio marcado (4) mostró focos de extensas a confluentes que afectaban a la mayoría/la totalidad del tejido.

Conclusiones

- 5 Un objetivo de este estudio era determinar la inmunogenicidad y la capacidad protectora del ARN de replicón en el modelo de RSV de rata del algodón. Otro objetivo era evaluar el efecto de las formulaciones de liposomas y de CNE17 en la inmunogenicidad y eficacia de la vacuna. El ARN de replicón no formulado indujo IgG específica de F en suero y anticuerpos neutralizantes de RSV después de una vacunación, y esta respuesta se reforzó mediante una segunda vacunación. Las formulaciones de liposomas y d CNE17 fueron eficaces de manera similar en este
- 10 modelo, reforzando los títulos de IgG específica de F a 1 µg de ARN de replicón aproximadamente 8 veces y los títulos de neutralización en 4-10 veces (CNE17 y liposomas, respectivamente) después de la segunda vacunación. Todas las vacunas de ARN de replicón proporcionaron protección frente a una exposición nasal a RSV, reduciendo la carga vírica en el pulmón en más de 3 órdenes de magnitud cuando se mide 5 días después. La magnitud y capacidad protectora de la respuesta inmunitaria generada por 1 µg de ARN de replicón formulado con liposomas fue de entre 2 veces la respuesta provocada por 5x10⁶ VRP. La subunidad de trímero adyuvada con alumbre provocó los máximos títulos de ELISA de IgG anti-F totales, provocó los títulos de neutralización más altos, y provocó el mayor grado de protección frente a títulos de RSV en el pulmón tras la exposición de cualquiera de las
- 15

preparaciones de vacuna ensayadas en el presente estudio.

Ejemplo 7B - Estudio de inmunogenicidad de RSV F (10-1001)

5 El replicón A317, que expresa la glucoproteína de fusión de superficie de RSV (RSV F) se usó para este experimento. Se administró a ratones BALB/c, 10 animales por grupo, vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 221 con VRP que expresan RSV F (1x10⁶ UI), ARN autorreplicante desnudo (A317, 1 µg), ARN autorreplicante administrado usando electroporación (A317, 10 µg), ARN autorreplicante formulado en liposomas [RV01(01), A317, 0,1 µg o 1 µg) y ARN autorreplicante formulado con CNE17 (A317, 0,1 µg o 1 µg). Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2sd1), 35 (2sd2) y 49 (4sd2). Se recogieron los bazos de 5 ratones por grupo en el día 49 (4sd2) para el análisis de linfocitos T.

10 **Resultados**

Tabla 11: Título de IgG en suero específica de F en el día 14

	1 µg A317	0,1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0,1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 UI VRP
	529	14385	19299	2429	3373	5	6041
	1530	10713	19170	2060	4417	88	4912
	2734	12756	13860	2012	1927	964	12923
	2503	11546	17352	1887	3597	7235	7075
	5539	15300	22094	3174	5731	2558	6829
	1033	14072	21213	3904	2852	5105	4885
	5110	18274	17915	1481	3739	9806	3680
	1106	7873	15659	2345	4904	2787	9813
	1493	17175	6669	3084	3824	2576	8631
	3456	19730	13259	2497	3004	1858	6314
GMT	1980	13731	15903	2398	3590	1180	6685

Tabla 11. (10-1001) títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 10 animales por grupo, 14 días después de vacunación intramuscular. Los datos se representan como títulos para ratones individuales y las medias geométricas de los títulos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 12: Título de IgG en suero específica de F en el día 35

	1 µg A317	0,1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0,1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 UI VRP
	958	128208	227021	48079	8473	14612	813045
	12518	191729	212911	17589	58556	22805	365485
	4839	315786	303987	8522	12053	32156	961601
	10128	218147	335071	10985	20395	24090	349215
	18451	225622	155893	30801	51514	31053	297526
	9805	182693	519162	13372	26348	18105	207652
	19154	185342	169332	5137	80686	23918	1580066
	4490	82744	489441	47173	21014	9091	900889
	14674	190010	131361	78232	61076	21006	822285
	15223	553164	254500	24135	25499	9835	587121
GMT	8532	201892	253687	20767	29111	19117	579033

Tabla 12. (10-1001) títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis de anticuerpos en el día 35 (2sd2). Los datos se representan como títulos para ratones individuales y las medias geométricas de los títulos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 13: Título de IgG en suero específica de F en el día 49

	1 µg A317	0,1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0,1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 UI VRP
	1248	140407	133787	52747	34245	30388	366771
	12441	155669	182995	29352	128030	20768	209400
	4967	203059	211020	10857	17016	53763	360615
	14536	134253	488698	28800	57250	28373	191475
	31556	370726	158816	44613	76576	34318	139148
	13815	184738	185184	20314	42357	35736	63839
	20495	141644	103026	4546	101445	34611	192101
	4800	76711	312096	27476	47285	10138	177858
	19159	143275	139811	68386	55865	23958	130218
	26836	479594	230331	24360	52871	13624	174378
GMT	10947	177168	194350	24891	53615	25888	180420

Tabla 13. (10-1001) títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis de anticuerpos en el día 49 (4sd2). Los datos se representan como títulos para ratones individuales y las medias geométricas de los títulos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 14: Títulos de neutralización de suero de RSV en el día 35

	A317, 1 µg	RV01(01) 0.1µg	RV01(01) 1µg	CNE17 0,1µg	CNE171µg	VRP 1E6 UI
	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2
	NA	143	106	NA	NA	265
	NA	272	62	NA	NA	73
	NA	294	<40	NA	NA	77
	NA	814	334	NA	NA	140
	NA	67	86	NA	NA	290
	NA	420	125	NA	NA	134
	NA	<40	566	NA	NA	466
	NA	104	292	NA	NA	127
	NA	241	<40	NA	NA	75
	NA	223	44	NA	NA	77
GMT	NA	176	96	NA	NA	139

Tabla 14: (10-1001) títulos de neutralización de suero de RSV, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis en el día 35 (2sd2). Los datos se representan como los títulos de neutralización de reducción de placa del 60 % de ratones individuales y la media geométrica del título de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <40 (límite de detección) se le asignó un título de 20.
NA = no ensayado.

Tabla 15: Títulos de neutralización de suero de RSV en el día 49

	A317, 1µg	RV01(01) 0.1µg	RV01(01) 1µg	CNE17 0,1µg	CNE171µg	VRP 1E6 UI
	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2
	<40	194	82	<40	<40	161
	<40	272	165	<40	70	64
	<40	142	<40	<40	<40	126
	<40	881	442	<40	76	151
	<40	61	108	42	57	194
	<40	426	156	52	<40	123
	<40	78	814	<40	<40	1033
	<40	<40	291	173	<40	174
	<40	246	103	<40	<40	122
	<40	574	396	<40	<40	76
GMT	<40	231	215	29	29	155

Tabla 15: (10-1001) títulos de neutralización de suero de RSV, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis en el día 49 (4sd2). Los datos se representan como los títulos de neutralización de reducción de placa del 60 % de ratones individuales y la media geométrica del título de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <40 (límite de detección) se le asignó un título de 20.
NA = no ensayado.

Tabla 16: Respuestas de linfocitos T en el día 49

Respuestas de linfocitos T CD4 esplénicos 4sd2	Linfocitos T CD4+CD8- esplénicos: % de positivos a citocinas y específicos para péptido RSV F51-66			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 UI	0,07 ± 0,06	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,02	0,10 ± 0,04
1 µg A317	0,00 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
RV01(01) 1 µg	0,04 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,00 ± 0,01	0,09 ± 0,03
RV01(01) 0,1 µg	0,06 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,10 ± 0,03
CNE17 1 µg	0,00 ± 0,05	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,02
CNE17 0,1 µg	0,00 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,02
10 µg vA317 + EP	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,03
Ninguno	0,04 ± 0,06	0,00 ± 0,05	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,01

Tabla 16. (10-1001) Frecuencias de linfocitos T esplénicos CD4+ específicos de RSV F en el día 49 (4sd2). Se muestra la frecuencia positiva a citocinas (%) neta (específica de antígeno) ± semi-intervalo de confianza al 95 %. Las frecuencias netas mostradas en negrita indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas > 0.

5

Tabla 17: Respuestas de linfocitos T en el día 49

Respuestas de linfocitos T CD8 esplénicos 4sd2	Linfocitos T CD8+CD4- esplénicos: % de positivas a citocinas y específicas para los péptidos F85-93 y F249-258 de RSV F			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 UI	3,48 ± 0,29	1,21 ± 0,18	-0,03 ± 0,05	3,31 ± 0,28
1 µg A317	0,74 ± 0,15	0,46 ± 0,11	-0,03 ± 0,04	0,70 ± 0,14
RV01(01) 1 µg	3,69 ± 0,28	1,43 ± 0,18	-0,01 ± 0,04	3,44 ± 0,27
RV01(01) 0,1 µg	2,52 ± 0,23	1,10 ± 0,15	0,03 ± 0,03	2,31 ± 0,22
CNE17 1 µg	1,25 ± 0,17	0,60 ± 0,12	0,01 ± 0,03	1,15 ± 0,16
CNE17 0,1 µg	0,89 ± 0,15	0,49 ± 0,11	-0,03 ± 0,04	0,83 ± 0,14
10 µg A317 + ep	0,85 ± 0,15	0,53 ± 0,11	0,01 ± 0,04	0,72 ± 0,15
Ninguno	0,01 ± 0,07	0,00 ± 0,05	-0,02 ± 0,05	0,02 ± 0,06

Tabla 17. (10-1001) Frecuencias de linfocitos T esplénicos CD8+ específicos de RSV F en el día 49 (4sd2). Se muestra la frecuencia positiva a citocinas (%) neta (específica de antígeno) ± semi-intervalo de confianza al 95 %. Las frecuencias netas mostradas en negrita indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas > 0.

Conclusiones

La formulación de liposomas potenció significativamente la inmunogenicidad, según se determina por los títulos de IgG específica de F aumentados (aumento de 8-30 veces), títulos de neutralización, y respuestas de linfocitos T CD4 y CD8, en relación al control de ARN desnudo. Sorprendentemente, los títulos de IgG específicos de F y los títulos de neutralización para RV01(01) a las dosis tanto de 0,1 como de 1,0 µg fueron equivalentes al VRP (1x10⁶ UI). Las respuestas de linfocitos T para la formulación de LNP fueron equivalentes a la dosis mayor con las de VRP (1x10⁶ UI). La formulación del ARN autorreplicante con CNE17 potenció significativamente la inmunogenicidad, según se determina por los títulos de IgG específica de F aumentados (aumento de 2-5 veces), títulos de neutralización, y respuestas de linfocitos T CD4 y CD8, en relación al control de ARN desnudo. La electroporación del ARN potenció la inmunogenicidad en relación al control de ARN desnudo, pero fue significativamente menor que la administración de liposoma.

Ejemplo 7C - Estudio de inmunogenicidad de RSV F (10-1018)

El replicón A317, que expresa la glucoproteína de fusión de superficie de RSV (RSV F) se usó para este experimento. Se administró a ratones BALB/c, 8 animales por grupo, vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) en los días 0 y 21 con VRP que expresan RSV F (1x10⁶ UI), ARN autorreplicante desnudo (A306, 1, 0,1, 0,01 µg) y ARN autorreplicante formulado en liposomas (RV01(01) usando el procedimiento 1 (A317, 10,0, 1,0, 0,1, 0,01 µg). Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2sd1) y 35 (2sd2). Se recogieron los bazos de 5 ratones por grupo en el día 49 (4sd2) para el análisis de linfocitos T.

Resultados

La formulación de liposomas RSV01(01) tenía un tamaño medio Z de diámetro de partícula de 158 nm, con un índice de polidispersión de 0,14, siendo la eficacia de encapsulación del 96 %. Los títulos de IgG en suero específica de F en los días 14 y 35 se muestran en las tablas 18 y 19 y las respuestas de linfocitos T en el día 49 se muestran en las tablas 20 y 21.

Tabla 18: Título de IgG en suero específica de F en los días 14 y 35

	VRP 1E6 UI		A317					
			1 µg		0,1 µg		0,01 µg	
	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2
	6334	39539	772	4687	5	2334	143	1377
	1500	14895	5	142	5	161	5	333
	5450	38252	109	2972	5	145	5	5
	1835	12831	5	3674	5	97	5	5
	2277	30326	5	5003	5	1077	5	175
	2818	33437	663	8258	221	457	5	5
	2405	22551	257	845	5	1558	5	456
	2137	19179	5	1765	5	5	5	180
GMT	2735	24427	41	2144	8	259	8	73

Tabla 18: (10-1018) títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2sd1) y 35 (2sd2). Los datos se representan como ratones individuales y la media geométrica de los títulos de 8 ratas del algodón individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 19: Título de IgG en suero específica de F en los días 14 y 35

	RV01(01)							
	10 µg		1 µg		0,1 µg		0,01 µg	
	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp2	2wp2	2wp1	2wp2
	5880	82689	7255	45018	4072	22174	619	2872
	6126	42529	3009	22288	3974	27730	474	3603
	8069	76263	5385	23561	3272	15328	914	2692
	5966	108234	4148	53675	3968	24456	2011	11542
	8590	57912	4210	37004	4950	13014	903	4684
	7172	74162	2179	24179	2856	13694	1575	6720

(continuación)

	RV01(01)							
	10 µg		1 µg		0,1 µg		0,01 µg	
	8072	122796	1640	5994	4073	17849	438	16514
8706	83601	5725	28760	3797	17342	1058	13665	
GMT	7235	77338	3783	25790	3826	18325	879	6235

Tabla 19: Continuación desde 23A. (10-1018) títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recogió suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2sd1) y 35 (2sd2). Los datos se representan como animales individuales y la media geométrica de los títulos (GMT) de 8 ratas del algodón individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 20: Respuestas de linfocitos T en el día 49

Respuestas de linfocitos T esplénicos 4sd2	Linfocitos T CD4+CD8- esplénicos: % de positivos a citocinas y específicos para péptido RSV F51-66			
	IFNγ+	IL2+	IL5+	TNFα+
VRP 1E6 UI	0,00 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,07 ± 0,03
1 mg A317	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
0,1 µg A317	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
0,01 µg A317	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01
RV01(01), 10 µg	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,02
RV01(01), 1 µg	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,09 ± 0,02
RV01(01), 0,1 µg	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
RV01(01), 0,01 µg	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02
Ninguno	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Tabla 20. Frecuencias de linfocitos T esplénicos CD4+ específicos de RSV F en el día 49 (experimento 10-1018, 4wp2). Se muestra la frecuencia positiva a citocinas (%) neta (específica de antígeno) ± semi-intervalo de confianza al 95%. Las frecuencias netas mostradas en negrita indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas > 0.

Tabla 21: Respuestas de linfocitos T en el día 49

Respuestas de linfocitos T esplénicos 4sd2	Linfocitos T CD8+CD4- esplénicos: % de positivas a citocinas y específicas para los péptidos F85-93 y F249-258 de RSV F			
	IFNγ+	IL2+	IL5+	TNFα+
VRP 1E6 UI	2,45 ± 0,21	0,58 ± 0,10	0,00 ± 0,01	2,64 ± 0,21
1 µg A317	1,68 ± 0,17	0,45 ± 0,09	0,00 ± 0,02	1,75 ± 0,18
0,1 µg A317	0,21 ± 0,07	0,08 ± 0,04	0,01 ± 0,02	0,30 ± 0,08
0,01 µg A317	0,06 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,16 ± 0,06
RV01(01), 10 µg	3,32 ± 0,23	0,69 ± 0,11	0,00 ± 0,02	3,90 ± 0,25
RV01(01), 1 µg	1,81 ± 0,17	0,59 ± 0,10	0,00 ± 0,02	2,04 ± 0,20
RV01(01), 0,1 µg	0,91 ± 0,12	0,32 ± 0,07	0,00 ± 0,01	1,06 ± 0,14
RV01(01), 0,01 µg	0,58 ± 0,10	0,33 ± 0,08	0,00 ± 0,01	0,64 ± 0,11
Ninguno	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,05

Tabla 21. Frecuencias de linfocitos T CD8+ esplénicos específicos de F en el día 49 (experimento 10-1018, 4wp2). Se muestra la frecuencia positiva a citocinas (%) neta (específica de antígeno) ± semi-intervalo de confianza al 95%. Las frecuencias netas mostradas en negrita indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas > 0.

La formulación de liposomas potenció significativamente la inmunogenicidad, según se determina por títulos de IgG específica de F y frecuencias de linfocitos T aumentados, en relación a los controles de ARN desnudo. Los títulos de IgG específica de F y las frecuencias de linfocitos T CD8 para RV01(01) a la dosis de 10 µg de ARN se vieron potenciados en relación al grupo de VRP (1x10⁶ UI).

5 REREFERENCIAS ADICIONALES

1. *Fields Virology*. 4ª edición, 2001.
2. Snell y col. (1997) *Virus Genes* 14:63-72.
3. Bembridge y col. (1999) *J Virol* 73: 10086-10094.
4. Li y col. (1998) *J Exp Med* 188:681-688
- 10 5. Patente de Estados Unidos n.º 6.060.308.
6. Yin y col. (2006) *Nature* 439:38-45.
7. Kim y col. (2007) *J Med Virol* 79: 820-828.
8. Yin y col. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(26): 9288-93).
9. Chen y col. (2004) *J Virol* 78:4508-16.
- 15 10. Yang y col. (2002) *J Virol* 76:4634-42.
11. Harbury y col. (1993) *Science* 262:1401-1407.
12. Stevens y col. (2004) *Science* 303:1866-70.
13. Burkhard y col. (2001) *Trends Cell Biol* 11:82-88.
14. Sección 5.5.2 de *Proteins de Creighton* (ISBN 0-7167-2317-4).
- 20 15. Yu (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:1113-1129.
16. Muller y col. (2000) *Methods Enzymol* 328:261-282.
17. Beck y Brodsky (1998) *J Struct Biol* 122:17-29.
18. Lupas (1996) *Trends Biochem Sci* 21:375-382.
19. Adamson y col. (1993) *Curr Opin Biotechnol* 4:428-347.
- 25 20. Kammerer (1997) *Matrix Biol* 15:555-568.
21. Chao y col. (1998) *J Chromatog B Biomed Sci Appl* 715:307-329.
22. Arndt y col. (2002) *Structure* 10:1235-1248.
23. Liu y Lu (2002) *J Biol Chem* 277:48708-48713.
24. Documento WO2006/011060.
- 30 25. Sección 5.5.3 de *Proteins de Creighton* (ISBN 0-7167-2317-4).
26. Zhang y Chen (1999) *J Biol Chem* 274:22409-22413.
27. Slovic y col. (2003) *Protein Sci* 12:337-348
28. Gardner y Dutch (2007) *J Virol* 8 1:8303-14.
29. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practise of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- 35 30. Nony y col. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
31. Greenbaum y col. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
32. Zurbriggen y col. (2003) *Expert Rev Vaccine* 2:295-304.
33. Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.

34. Mann y col. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
35. Halperin y col. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
36. Herbert y col. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
37. Chen y col. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
- 5 38. Patente de Estados Unidos n.º 6355271.
39. Documento WO00/23105.
40. Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540.
41. Documento WO96/33739.
42. EP-A-0109942.
- 10 43. Documento WO96/11711.
44. Documento WO00/07621.
45. Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery, Reviews* 32:247-271.
46. Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
47. Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- 15 48. Documento WO95/17211.
49. Documento WO98/42375.
50. Singh y col (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
51. Documento WO99/27960.
52. Patente de Estados Unidos n.º 6.090.406.
- 20 53. Patente de Estados Unidos n.º 5.916.588.
54. EP-A-0626169.
55. Documento WO99/52549.
56. Documento WO01/21207.
57. Documento WO01/21152.
- 25 58. Dyakonova y col. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
59. FR-2859633.
60. Signorelli y Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
61. Documento WO2004/064715.
62. De Libero y col, (2005) *Nature Reviews Immunology* 5:485-496
- 30 63. Patente de Estados Unidos n.º 5.936.076.
64. Old y col., *J Clin Investig*, 113:1631-1640
65. Documento US2005/0192248.
66. Yang y col. (2004) *Angew Chem Int Ed* 43:3818-3822
67. Documento WO2005/102049.
- 35 68. Goffet y col (2004) *Am Chem Soc* 126:13602-13603
69. Documento WO03/105769.
70. Cooper (1995) *Harm Biotechnol* 6:559-80.

71. Documento WO90/14837.
72. Podda y Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
73. Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- 5 74. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
75. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research, Protocols* (Volumen42 de *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
76. Allison y Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
77. Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- 10 78. Documento WO95/1 1700.
79. Patente de Estados Unidos n.º 6.080.725.
80. Documento WO2005/0971 81.
81. Tassignon y col. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
82. Myers y col. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.
- 15 83. Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de la referencia 75.
84. Johnson y col. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
85. Baldrick y col. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
86. Patente de Estados Unidos n.º 4.680.338.
87. Patente de Estados Unidos n.º 4.988.815.
- 20 88. Documento WO92/15582.
89. Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:57 1-577.
90. Wu y col. (2004) *Antiviral Res.* 64(2): 79-83).
91. Vasilakos y col. (2000) *Cell Immunol.* 204(1): 64-74).
- 25 92. Patentes de los Estados Unidos n.º 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
93. Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
94. Documento WO2004/060308.
95. Documento WO2004/064759.
- 30 96. Patente de Estados Unidos n.º 6.924.271.
97. Documento US2005/0070556.
98. Patente de Estados Unidos n.º 5.658.731.
99. Patente de Estados Unidos n.º 5.011.828.
100. Documento WO2004/87 153.
- 35 101. Patente de Estados Unidos n.º 6.605.617.
102. Documento WO02/18383.
103. Documento WO2004/018455.
104. Documento WO03/082272.

105. Documento WO2006/002422.
106. Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
107. Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccine* 2:219-229.
108. Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- 5 109. Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
110. Thompson y col. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.
111. Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
112. Documento WO02/26757.
113. Documento WO99/62923.
- 10 114. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
115. McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
116. Documento WO98/40100.
117. Patente de Estados Unidos n.º 6.207.646.
118. Patente de Estados Unidos n.º 6.239.116.
- 15 119. Patente de Estados Unidos n.º 6.429.199.
120. Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3): 654-658.
121. Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
122. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
123. Documento WO01/9593.
- 20 124. Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
125. Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
126. Documento WO03/035836.
127. Documento WO01/22972.
- 25 128. Thompson y col. (2005) *J Leukoc Biol* 78: "The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells".
129. Solicitud de Patente del R.U GB-A-22202 11.
130. Documento WO94/21292.
131. Documento WO94/00153.
132. Documento WO95/17210.
- 30 133. Documento WO96/26741.
134. Documento WO93/19780.
135. Documento WO03/011223.
136. Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-249 1.
137. Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- 35 138. Patente de Estados Unidos n.º 6.586.409.
139. Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
140. Documento US2005/0215517.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido F del virus respiratorio sincitial (RSV F) recombinante en el cual los aminoácidos 100-150, numerados en relación a la SEC ID N°: 1, se reemplazan con la secuencia de aminoácidos de:

TPATNNRARQQQRFLGFLGVSIAIAS (SEC ID N°: 9).

5 2. El RSV F de la reivindicación 1, en el que el RSV F está en forma de un monómero, trímero, roseta de trímeros o combinaciones de los mismos.

3. Un polipéptido recombinante seleccionado entre el grupo que consiste en:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
 VITIELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ
 QQQRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNNGVS
 VLTSKVLDLKKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAG
 VTPPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFF
 PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
 TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
 QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 AGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 49) y

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
 VITIELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ
 QQQRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNNGVS
 VLTSKVLDLKKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAG
 VTPPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFF
 PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
 TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
 QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
 DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHHH (SEC ID N°: 60),

10 cualquiera de las secuencias anteriores en las que se omite el péptido de señal y/o el marcador HIS, y combinaciones de los mismos.

4. El polipéptido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende un dominio de oligomerización heterólogo o un péptido de señal.

15 5. El polipéptido recombinante de la reivindicación 4, en el que dicho dominio de oligomerización heterólogo se selecciona entre el grupo que comprende un dominio de trimerización de hemaglutinina de la gripe, de spike de SARS, o de gp41, NadA, GCN4 modificada o ATCasa de VIH.

6. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

7. Una composición inmunogénica que comprende:

(a) uno o más polipéptidos F del virus respiratorio sincitial (RSV F) de acuerdo con la reivindicación 1; preferentemente en el que:

- (i) dicho polipéptido RSV F es un polipéptido soluble que comprende el ectodominio de RSV F; o
- (ii) dicho RSV F comprende los aminoácidos 23-99 y 151-524 de:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARRE
LPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKRRRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGE
VNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIV NKQSCSISNIET
VIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLM
SNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEG
SNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCN
VDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGC
DYVSNKGM DTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP SDEFDASIS
QVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVII VILLSLIAVGLLLYCK
ARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEC ID N°: 1) o

MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSV
ITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRE
APQYMNYTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVN
KIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLLPV NKQSCRISNIETVI
EFQQMNSRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSS

NVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNIC
LTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIF
NSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFP SDEFDASISQVNE
KINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVII VILLSLIAIGLLLYCKAKNTP
VTL SKDQLSGINNI AFSK (SEC ID N°: 2)

5

o

(b) un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ
QQQRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNAGVS
VLTSKVLDLKKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAG
VTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFF
PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTNGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 49)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ
QQQRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNAGVS
VLTSKVLDLKKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAG
VTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFF
PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (SEC ID N°: 60)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ
QQQRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNAGVS
VLTSKVLDLKKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAG
VTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFF
PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTN (SEC ID N°: 71),

y cualquiera de las secuencias anteriores en las que se omitan el péptido de señal y opcionalmente el marcador HIS, en las que el péptido de señal corresponde a los aminoácidos 1-121 de SEC ID N°: 1, y en el que el

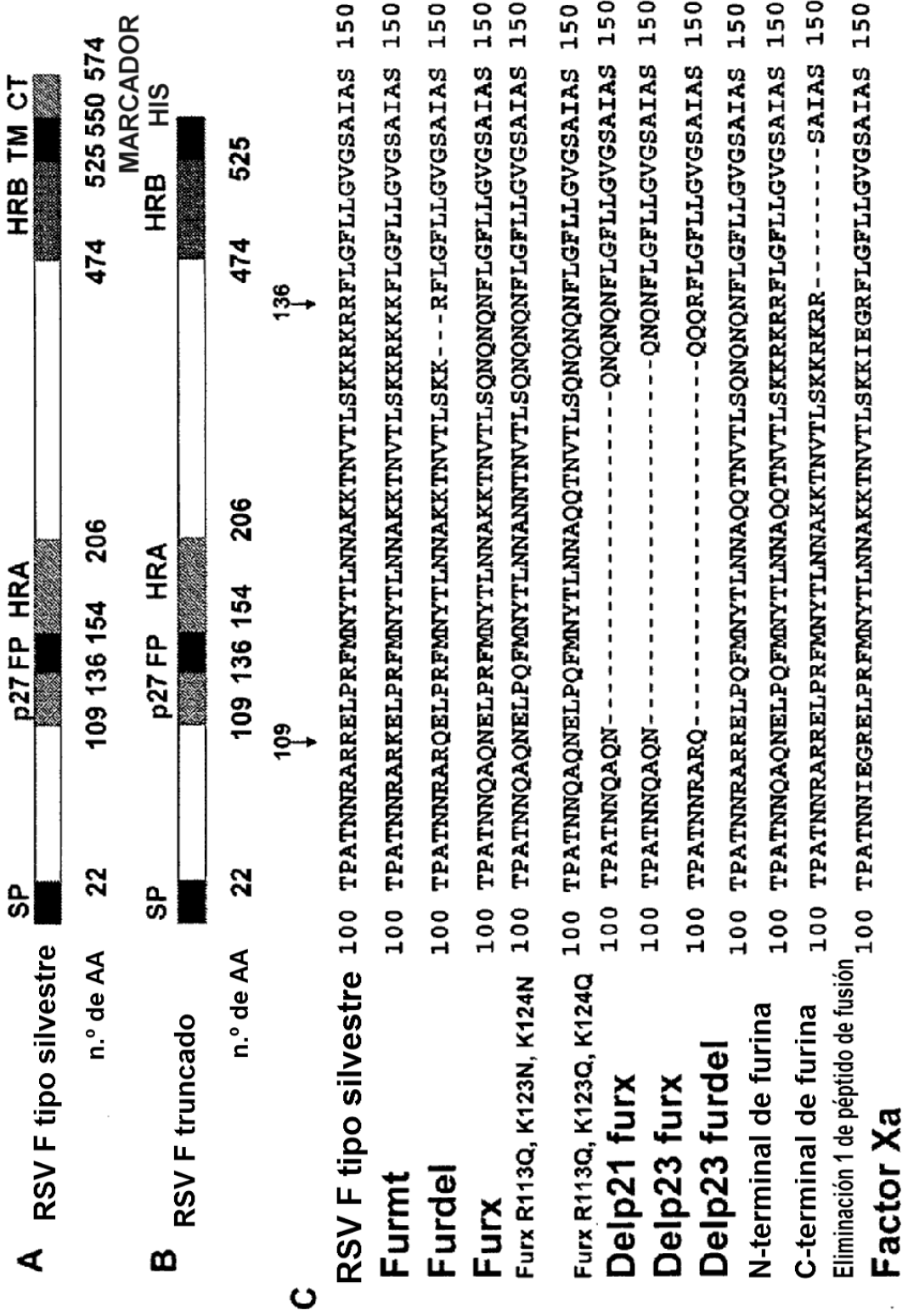
marcador His corresponde a SEC ID N°: 110.

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, que además comprende un adyuvante.

5 9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que el adyuvante se selecciona entre el grupo que consiste en: una sal de aluminio, una emulsión de escualeno en agua, un inmunopotenciador de molécula pequeña y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

10. Una composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Figura 1



Construcciones a escindir de la superficie celular

```

RSV F tipo silvestre 488 FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVDKSTTN----- TM-C
Ent idealizado      488 FDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGDDDDKGGSG----- TM-C
GCN Ent             488 FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGSGDDDDKGGSG TM-C
FacXa idealizado   488 FDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGIEGRGSG----- TM-C
GCN Thr             488 FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGSGIEGRGSG TM-C
Thr idealizado     488 FDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGGLVPRGSG----- TM-C
GNC Thr            488 FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGSGGLVPRGSG- TM-C
    
```

TM-C = dominio transmembrana + cola C terminal =

IMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Ent = sitio de escisión de enterocinasa - DDDDK

FacXa = sitio de escisión de factor Xa - IEGR

Thr = sitio de escisión de trombina - LVPR

Figura 2

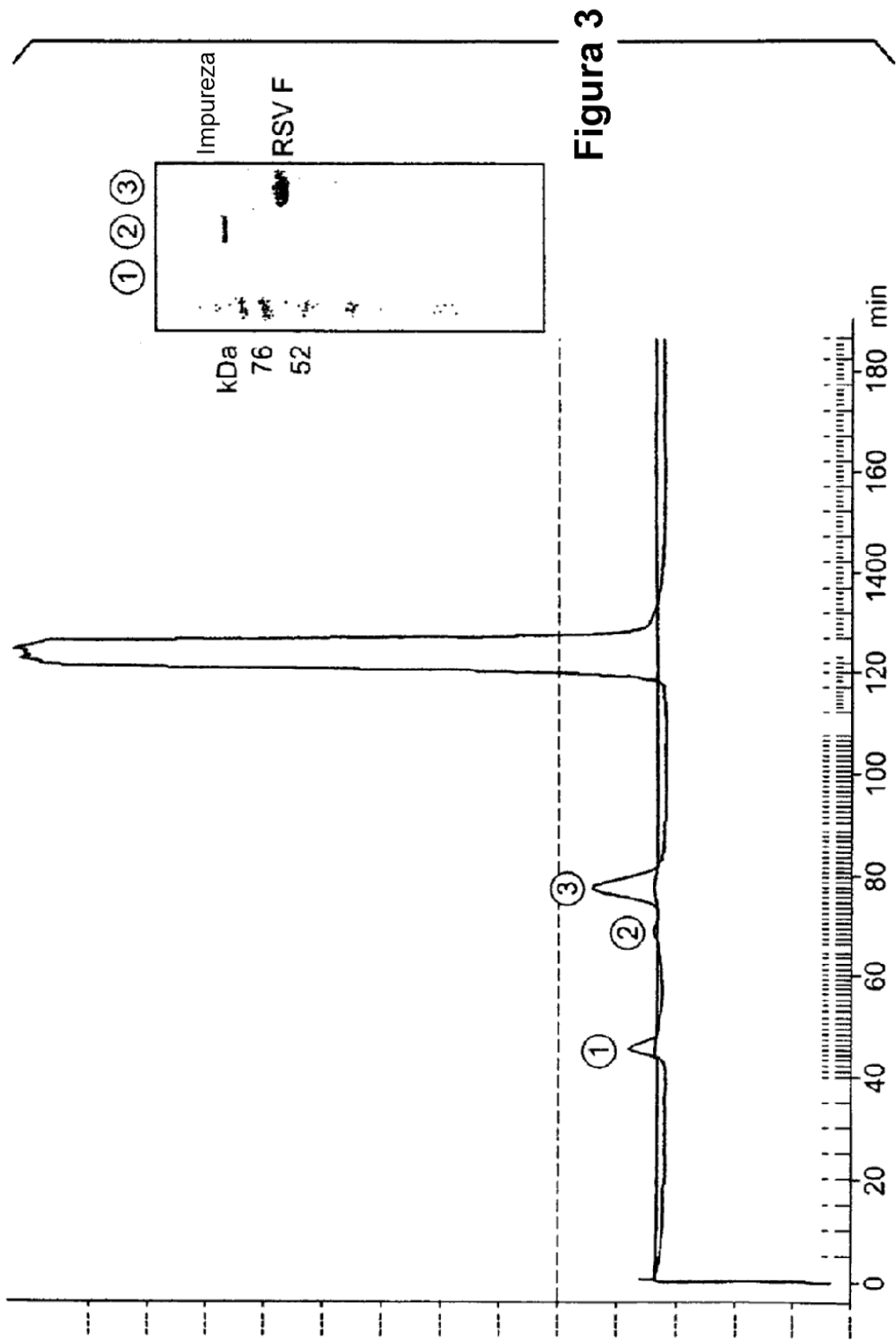


Figura 3

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA
 GGAAGACAGCCCATTCCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTC
 ACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGG
 ACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCA
 TTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAA
 AACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCCGCGTCATGAGCGACC
 CTGACCTGGAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGT
 TTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTC
 GCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACT
 CTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGA
 GCGGTACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAAGATATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCT
 GTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACT
 TACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAG
 AATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTC
 TTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAG
 CTACATTGTGTGACCAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGGGACGACGCGCAAAAACCTGCT
 GGTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTAC
 CTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAA
 GGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAAC
 ATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTTCGTGCTG
 CCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACA
 AGGAGCCGTACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGGCGAGCCGATGAGGCTAAGGA
 GGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTG
 GAAGCCGATGTAGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAA
 AGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAA
 GAGTGAAAAATTATCTTGATCCACCCTCTCGCTGAAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAA
 GGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGG
 ACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTGTAACAGGTACCTGCA
 CCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAG
 CACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAAACAGTGGCTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAG
 GGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACCACCAGC
 CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAA
 AGCGCAGTCAACAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAAGAAAACCTGTGCAGAAAATTATAAGGGACG
 TCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAACA
 CCCCCTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTGCATGCAGGTACTIONCTCAGAGCGCTCATAGCC

FIG. 4A

ATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAAACATGATGTGCC
 TAAAAGTGCATTTTAAACACGAGATTGACACAAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAA
 ATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACT
 AAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCAATTCTCACTTGTTTTAGAG
 GGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCCTCTCAAGGGCT
 GACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAA
 CATGTGAACGTCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGA
 TAAAAAACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA
 TGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGT
 TGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTG
 TGGATTATTTTGAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTT
 TGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGG
 GATAACTCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTGAGCTCTCTCGCAGGTACC
 CAAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA
 TCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACAC
 CCACAGAGTGACTTTTCTTCAATCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTCCGGGAAAAGT
 TGTCCGTCCCAGGCAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGA
 TTTAGGCATCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTGTTAATGTGAGGACCCATATAAATAC
 CATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATC
 TGAATCCCGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGG
 TGCTATAGCGCGCAGTTCAAGTTTTCCCGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTT
 CTGTTTGTATTCAATGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGA
 CCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGA
 TATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTG
 TGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTTCCCGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGAC
 TGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTATGCGGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCCGAGGTTGA
 AGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
 GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTTGAACC
 ATTTGCTGACAGCTTTAGACACCCTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAAT
 GACTCTCAAGGAAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTG
 ACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCA
 CAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGA
 AATTAATGCCATGTGCCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGC
 ATGAGCAGTATTAGGTGCAAAATGCCCCGTCGAAGAGTCCGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTT
 GCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAATTAC

FIG. 4B

TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCT
 ATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGAAAACACCACCGGTAG
 ACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACCTTATAAC
 CGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGT
 TTGCTGTCAGATGGCCCAGCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTAT
 CTAGCTCATCCTGGTCCATTCCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCT
 GGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG
 TTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAA
 GAACACCGTCACTTGCAACCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAA
 TAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTGCGTCTCGAGA
 ACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAG
 CACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACA
 ACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCTGTAT
 GCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTGCTA
 ACAGAAGCAGATAACAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGG
 CCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCTTTGTAT
 TCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAG
 AGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTGGACATGGTTGACGG
 AGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTCCAAAGAAACACTCC
 TATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAG
 CTGCCACAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTGCGCGGCCTTTTAA
 TGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGG
 CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAGAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGA
 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGT
 GAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCG
 CTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCCGTCTGCTTCCGA
 ACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGG
 GGATTGTGTTCTGGAAACTGACATCGCGTCTGTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG
 TTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAA
 TTTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCTT
 CACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACGGCTAACCGGA
 TCACCATGTGCAGCATTCAATTGGAGATGACAATATCGTGAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAG
 ACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAAGCGCCTTA
 TTTCTGTGGAGGGTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCTAAAA
 AGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGSCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC

FIG. 4C

ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTA
 TGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTACAGC
 TACCTGAGAGGGGCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCGACGCC
ACCATGGAAC TGCTGAT CCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCG
CCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAG
CGCCCTGCGGACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGTCCAACATCAAAGAAAACAAGTGC
AACGGCACCAGGCCAAGGTGAACTGATCAAGCAGGAACTGGACAAGTACAAGAAGCCCGTGACCGAGC
TGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAGCTGCCCCGGTTTCATGAA
CTACACCCTGAAACAACGCCAAGAAAACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTGGGC
TTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATCGCCAGCGGGGTGGCCGTGTCCAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCG
AGGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGAG
CGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAG
CAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAA
TCACCCGGGAGTTCAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGA
GCTGCTGTCCCTGATCAATGACATGCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAG
ATCGTGGGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGC
TGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACAC
CAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACCAGCCGGGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTG
AGCTTCTTCCCCCAAGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCC
TGACCCTGCCCTCCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCAT
GACCTCCAAGACCGACGTGAGCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAG
ACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCAGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGA
GCAACAAGGGCGTGGACACCCTGAGCGTGGGCAACACACTGTACTACGTGAATAAGCAGGAAGGCAAGAG
CCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCCTCCAGCGACGAGTTGCAC
GCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCCGGAAGAGCGACGAGCTGC
TGCACAATGTGAATGCCGGCAAGAGCACCACCAATATCATGATCACCACAATCATCATCGTGATCATTGT
GATCCTGCTGTCTCTGATTGCCGTGGCCCTGCTGCTGACTGCAAGGCCCGCAGCACCCCTGTGACCCTG
TCCAAGGACCAGCTGTCCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAGTGAAGTCTAGACGGCGCGCCACCC
AGCGGCCGCATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGCGATTGGCATGCCGCCTTAA
AATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAAATAPTTCAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGA
AGGAGGACGCACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCCACGTTTAAACCAGCTCCAATTCGCCCTATAG
TGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC
CAACTTAATCGCCTTGACGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC
GCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC

FIG. 4D

GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTC
TTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCC
ATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCC
CAAAC TGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTTCGGATTTTCGG
CCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTPAACCGGAATTTAACAAAAATTAACGCTTAC
AATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCA
GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATC
TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTAT
TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC
GCAAAC TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
TAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT
GATTAAGCATTGGTAACTGT CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTT
TAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTT
CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAACA AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCA
ACTCTTTTTCCGAAGGTAAC TGGCTT CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGT
AGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGT
GGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGGC
CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
TCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTC
TCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGA

FIG. 4E

GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCT
CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCA
AGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCACGCGTAATACGACTCACTA
TAG

FIG. 4F

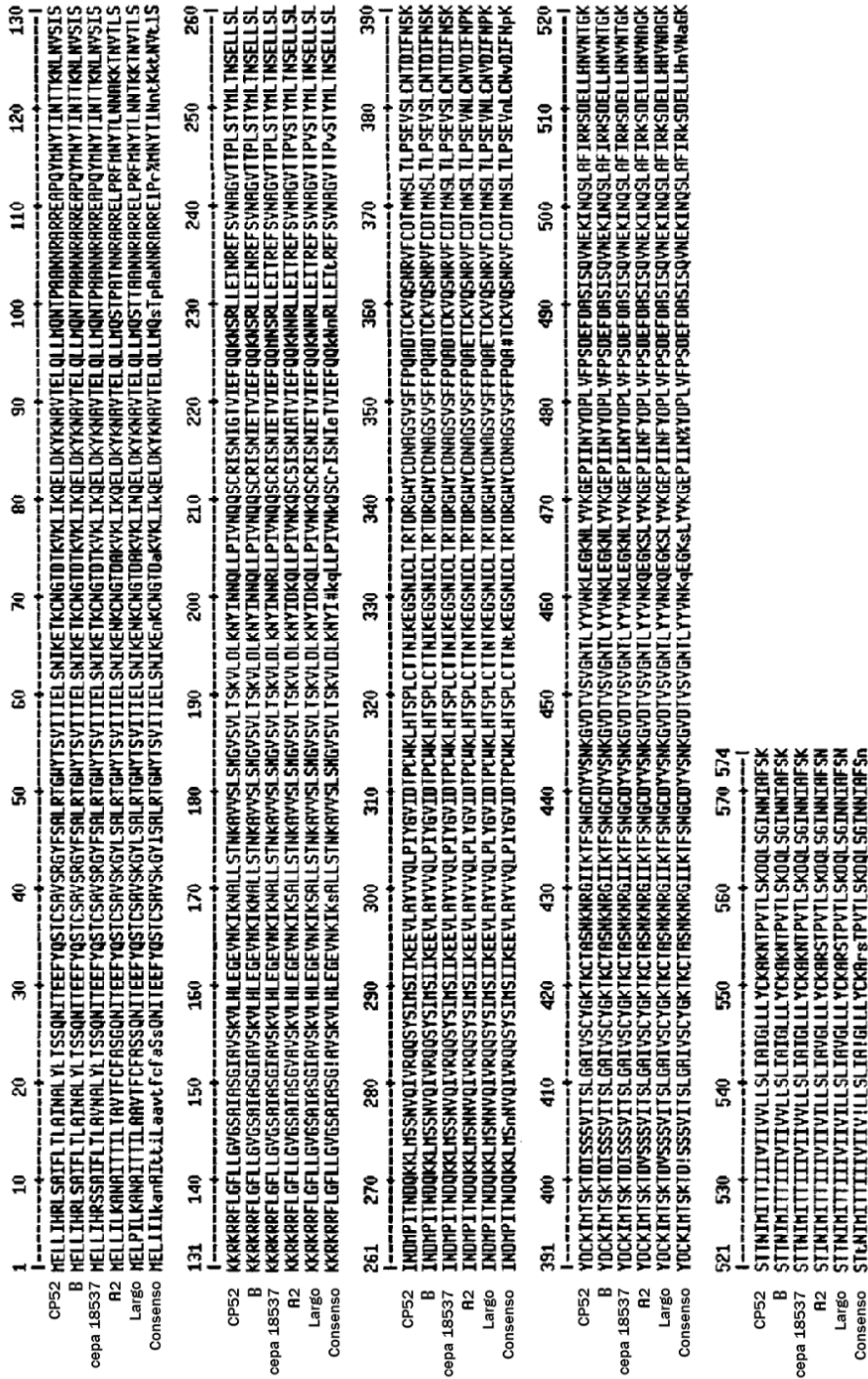


Figura 5

Figura 6: Cromatogramas típicos de purificación SEC de antígenos de RSV F seleccionados

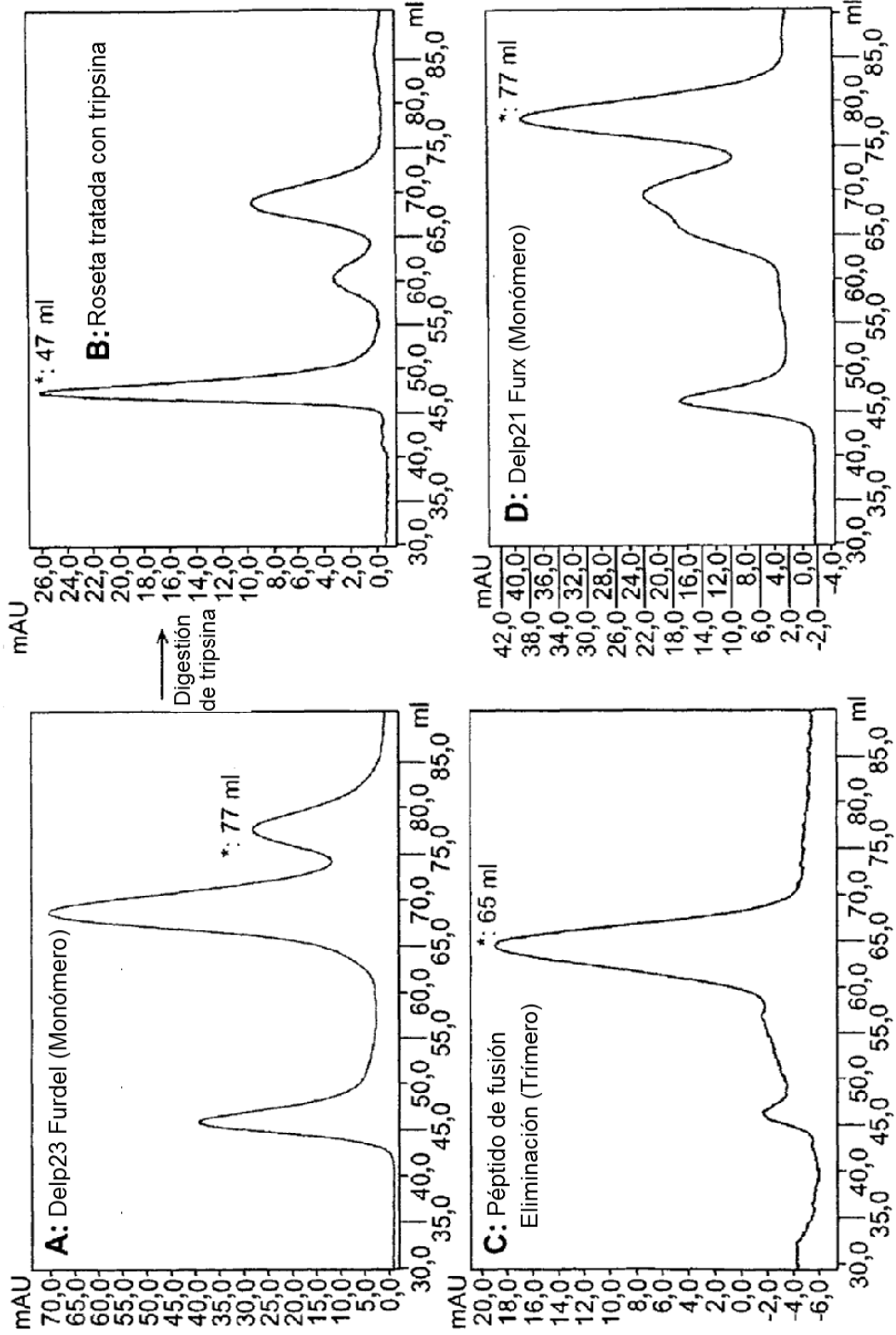


Figura 7: Análisis de EM y SDS-PAGE de antígeno de RSV F

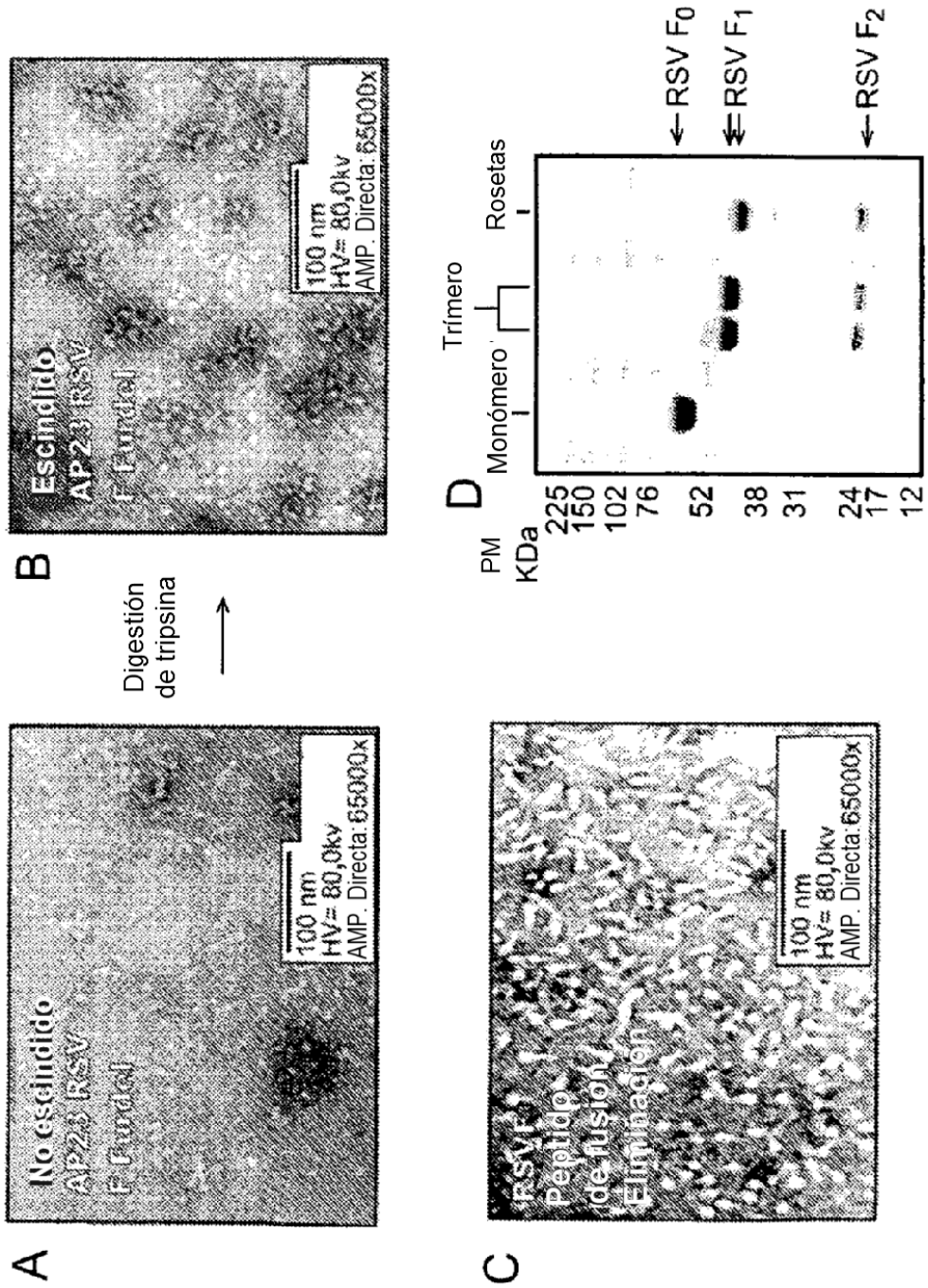


Figura 8: Inmunogenicidad de la subunidad RSV-F en ratas del algodón

