

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 378**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)

C07K 14/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/EP2014/058353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14719022 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2988780**

54 Título: **Polipéptidos F de prefusión del virus sincicial respiratorio (RSV) solubles y estabilizados**

30 Prioridad:

25.04.2013 EP 13165402

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

04.06.2019

73 Titular/es:

**JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**LANGEDIJK, JOHANNES PETRUS MARIA y
KRARUP, ANDERS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 715 378 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

Polipéptidos F de prefusión del virus sincicial respiratorio (RSV) solubles y estabilizados

La invención se relaciona con el campo de la medicina. La invención se relaciona en particular con polipéptidos F de prefusión recombinantes del RSV y usos de los mismos, por ejemplo en composiciones inmunogénicas.

5 Antecedentes de la invención

El virus sincicial respiratorio (RSV, por las iniciales en inglés de Respiratory Syncytial Virus) es un virus de ARN de cadena negativa, no segmentada, con envoltura, de la familia Paramixoviridae, género Pneumovirus. Mundialmente, se estima que cada año ocurren 64 millones infecciones por RSV como resultado de lo cual ocurren 160.000 muertes (WHO Acute Respiratory Infections Update septiembre 2009). La enfermedad más grave ocurre en particular en lactantes prematuros, personas de edad avanzada e individuos con compromiso inmunitario. En niños menores de 2 años, el RSV es el patógeno del tracto respiratorio más común, responsable de aproximadamente un 50% de las hospitalizaciones debido a infecciones respiratorias, con un pico de hospitalización a los 2-4 meses de edad. Se ha informado que a la edad de dos años casi todos los niños han sido infectados por el RSV. La infección repetida durante la vida se atribuye a una inmunidad natural poco efectiva. El nivel de carga de enfermedad por RSV, la mortalidad y la morbilidad en las personas de edad avanzada solo son superados por aquellos causados por las infecciones no pandémicas de gripe A.

Para infectar una célula huésped, los paramixovirus tales como el RSV, al igual que otros virus con envoltura, tales como el virus de la gripe y el VIH, requieren la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped. Para el RSV la proteína de fusión conservada (proteína F del RSV) fusiona la membrana viral y la membrana celular de la célula huésped. En modelos actuales basados en estudios de paramixovirus, la proteína F de RSV se pliega inicialmente en una conformación de "prefusión" metaestable. Durante la entrada a la célula, la conformación de prefusión sufre un nuevo plegamiento y cambios de conformación en su conformación de "postfusión" estable. Por consiguiente, la proteína F del RSV es una proteína metastable que impulsa fusión de la membrana acoplado el replegamiento irreversible de la proteína con la yuxtaposición de la membrana plegándose inicialmente en una forma metastable (conformación de prefusión) que subsiguientemente sufre cambios conformacionales discretos/paso a paso a una conformación de menor energía (conformación post-fusión).

Al ver la microscopía electrónica de RSV-F queda claro que existen grandes diferencias estructurales entre el trímero F prefusión y post-fusión, que recientemente han sido confirmadas por cristalografía (McLellan J.S. et al. Science 340(6136):1113-7 (2013) y McLellan J.S. et al. Science 342(6158): 592-8 (2013)). Dichas observaciones sugieren que proteína F de prefusión y post-fusión del RSV son antigénicamente diferentes (Calder, L. J. et al. Virology 271, 122-131 (2000)).

Actualmente no hay una vacuna contra la infección por RSV, pero resulta deseable encontrarla. Los candidatos de vacunas basados en la proteína F del RSV han fracasado debido a problemas, por ejemplo, de estabilidad, pureza, reproducibilidad, y potencia. Como se acaba de indicar, las estructuras cristalinas han revelado un gran cambio conformacional entre los estados prefusión y post-fusión. La magnitud de la acomodación sugiere que solo una porción de anticuerpos dirigidos a la conformación post-fusión de RSV-F será capaz de reaccionar de manera cruzada con la conformación nativa de la protuberancia prefusión en la superficie del virus. Por lo tanto, los esfuerzos por producir una vacuna contra RSV se han enfocado en el desarrollo de vacunas que contienen formas prefusión de la proteína F del RSV (véanse, por ejemplo, WO2010/1149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796, WO2012/158613). Sin embargo, dichos esfuerzos aún no han permitido obtener polipéptidos F de prefusión del RSV estables que se puedan utilizar como candidatos para probar en seres humanos.

Resumen de la invención

La presente invención provee polipéptidos de fusión (F) prefusión del virus sincicial respiratorio (RSV) estables y recombinantes, es decir polipéptidos F recombinantes del RSV estabilizados en la conformación de prefusión como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos F del RSV de la invención comprenden al menos un epítopo que es específico para la conformación de la proteína F de prefusión. En ciertas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV son solubles. En ciertas formas de realización, los polipéptidos están unidos a membrana. La invención también provee moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención y vectores que comprenden a dichas moléculas de ácido nucleico.

La invención también se relaciona con composiciones, preferiblemente composiciones inmunogénicas, que comprenden un polipéptido F de RSV, una molécula de ácido nucleico y/o un vector, y con el uso de los mismos en la inducción de una respuesta inmune contra la proteína F del RSV, en particular el uso de los mismos como una vacuna. Preferiblemente, la respuesta inmune que se induce se caracteriza por anticuerpos que neutralizan el RSV y/o por una inmunidad protectora contra el RSV.

55

Descripción breve de las Figuras

- Figura 1: A) Cromatograma de filtración en gel con Superdex200 del eluato A2_F24 N67I+S215P proveniente de la columna de intercambio de iones. Las flechas indican los puntos de elución de una proteína estándar (1-Tiroglobulina 669 kDa, 2-Ferritina 440 kDa y 3-IgG 150 kDa). B) Análisis por SDS-PAGE de la proteína F de prefusión que contienen picos del cromatograma SEG en condiciones reductoras.
- Figura 2: Transferencia de Western de NativePAGE® cargada con muestras que contienen 1) sobrenadante de células que expresan una construcción prefusión con la cremallera de isoleucina (S) F43; 2) Sobrenadante de células que expresan principalmente la proteína F post-fusión del RSV trimérica (banda superior), y 3) A2_F24 N67I trimérica de prefusión purificada.
- Figura 3: Niveles de expresión de las construcciones puntuales mutadas con relación a la A2_F24 no mutada.
- La Figura 4 muestra los resultados del método descrito en el Ejemplo 6(A), determinación de la temperatura donde se pierde el 50% de la unión de CR9501, (B) muestra una comparación de la estabilidad de polipéptido F de prefusión (A2_F24 N67I+S215P) y el ectodominio sin modificar cuando se avalúa por un 50% de pérdida de unión del anticuerpo CR9501 específico para prefusión.
- Figura 5: Mediciones por tecnología Octet que muestran la pérdida de unión del anticuerpo CR9501 específico para prefusión dependiente del tiempo de almacenamiento con las construcciones de prefusión, A) A2_F24 (SEQ ID N°: 19), B) A2_F24 K465Q, C) A2_F24 S46G, D) A2_F24 N67I y E) A2_F24 E92D los días 1, 5 y 33.
- Figura 6: Mediciones por tecnología Octet que muestran la pérdida de unión dependiente del tiempo de almacenamiento del anticuerpo monoclonal CR9501 específico para prefusión con las construcciones de prefusión, A) A2_F24 K465Q, B) A2_F24 K465Q+N67I, C) A2_F24 S46G, D) A2_F24 S46G+E92D, E) A2_F24 S46G+N67I, F) A2_F24 E92D, G) A2_F24 S46G+E92D, H) A2_F24 N67I+E92D y I) A2_F24 E92D+S215P los días 1, 5 y 33.
- Figura 7: Títulos de VNA de ratones la sexta semana después de un régimen de imprimación-refuerzo en la semana 0 y 4 con inmunógenos y dosis de acuerdo con la tabla 14.
- Figura 8: Títulos de VNA de ratas alodoneras la séptima semana después de un régimen de imprimación-refuerzo en la semana 0 y 4 con inmunógenos y dosis de acuerdo con la tabla 15.
- Figura 9: Carga viral en pulmón y nariz 5 días después de la exposición i.n. a RSV.

Descripción detallada de la invención

- La proteína de fusión (F) del virus sincicial respiratorio (RSV) está relacionada con la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped, lo que es necesario para la infección. El ARNm de la F de RSV se traduce en una proteína precursora de 574 aminoácidos denominada F0, que contiene una secuencia de péptido señal en el extremo N-terminal (por ejemplo los residuos de aminoácidos 1-26 de SEQ ID N°: 1) que es eliminado por una peptidasa de señal en el retículo endoplasmático. F0 se cliva en dos sitios (entre los residuos de aminoácidos 109/110 y 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi, eliminando una secuencia intermedia glicosilada corta (que también se denomina una región p27, que comprende a los residuos de aminoácidos 110 a 136, y que genera dos dominios o subunidades denominadas F1 y F2. El dominio F1 (residuos de aminoácidos 137-574) contiene un péptido de fusión hidrofóbico en su extremo N-terminal y el extremo C-terminal contiene la región transmembrana (TM) (residuos de aminoácidos 530-550) y citoplasmática (residuos de aminoácidos 551-574). El dominio F2 (residuos de aminoácidos 27-109) está unido covalentemente a F1 por dos puentes disulfuro. Los heterodímeros F1-F2 se ensamblan como homotrímeros en el virión.
- Actualmente no hay una vacuna contra la infección por RSV, pero sería deseable descubrirla. Un enfoque potencial para producir una vacuna es una vacuna de subunidades basada en la proteína F de RSV purificada. Sin embargo, para este enfoque es deseable que la proteína F del RSV purificada se encuentre en una conformación que se parezca a la conformación del estado prefusión de la proteína F del RSV, que es estable con el transcurso del tiempo, y que se pueda producir en cantidades suficientes. Además, para una vacuna basada en la subunidad, es necesario truncar la proteína F del RSV por delección de la región transmembrana (TM) y la citoplasmática para crear una proteína F secretada (sF) soluble. Como la región TM es responsable del anclaje a la membrana y de la trimerización, la proteína F soluble sin anclaje es considerablemente más lábil que la proteína de longitud completa y se volverá a plegar fácilmente en el estado final post-fusión. Por consiguiente, para obtener la proteína F soluble en la conformación de prefusión estable que muestre altos niveles de expresión y alta estabilidad, es necesario estabilizar la conformación de prefusión.
- La estabilización de otra proteína F de paramixovirus en la conformación de prefusión se ha conseguido con éxito para el parainfluenza de tipo 5 (PIV5). Yin et al. Nature 439: 38-44 (2006)) estabilizando por consiguiente la estructura de prefusión de la proteína F de PIV-5 por mutación del sitio de clivaje por furina en F0 que bloquea el procesamiento para obtener F1 y F2. Aún más, los dominios transmembrana (TM) y citoplasmático fueron reemplazados por un dominio de trimerización helicoidal bien conocido: GCN4pII. Este dominio forma una bucle trimérico helicoidal superenrollado y es una modificación del bucle helicoidal superenrollado natural del péptido dimérico GCN4 (O'Shea et al., Science 243:

538-542 (1989)). Se mostró que el péptido GCN4-pII, en el que la secuencia de aminoácidos de la cremallera de leucina de GCN4 fue sustituida por residuos de isoleucina en cada posición a y d de la héptada, forma una estructura superenrollada alfa-helicoidal de triple hebra paralela (Harbury et al., Science 262: 1401-1407 (1993)).

5 Para la estabilización de F de RSV en la conformación de prefusión, se intentó la misma estrategia, como por ejemplo la mutación del sitio de clivaje por furina, y fusión del ectodominio RSV-F a un dominio de trimerización GCN4pII (según se divulga por ejemplo, en WO2010/149743, WO2010/149745, WO2009/079796, WO2012/158613) o al dominio de trimerización de fibritina (MCLellan et al., Nature Struct. Biol. 17: 2-248-250 (2010)). Este dominio fibritina o 'Foldon' deriva de la fibritina T4 y fue descrito anteriormente como un dominio artificial de trimerización natural (Letarov et al., Biochemistry Moscow 64: 817-823 (1993); S-Guthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905-915. (2004)). Sin embargo, dichos esfuerzos no dieron como resultado una proteína F de prefusión de RSV estable. Además, dichos esfuerzos aún no han dado como resultado candidatos adecuados para pruebas en seres humanos.

15 Ahora, la presente invención provee polipéptidos F recombinantes de prefusión del RSV estables, es decir polipéptidos F del RSV que están estabilizados en la conformación de prefusión como se define en las reivindicaciones. En la investigación que llevó a la presente invención, se introdujeron y/o combinaron varios pasos de modificación para obtener dichos polipéptidos F de prefusión del RSV estables solubles. Los polipéptidos F de prefusión del RSV estables de la invención se encuentran en la conformación de prefusión, es decir que los mismos comprenden (muestran) al menos un epitope específico de la conformación de prefusión de la proteína F. Un epitope que es específico de la conformación de prefusión de la proteína F es un epitope que no se presenta en la conformación post-fusión. Sin considerar ninguna teoría particular, se cree que la conformación de prefusión, o formas intermedias de la proteína F de RSV, pueden contener epitopes iguales a los que se encuentran sobre la proteína F de RSV expresada en viriones naturales del RSV, y por ello proporcionan ventajas para generar anticuerpos neutralizantes.

20 Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden al menos un epitope que puede ser reconocido por un anticuerpo monoclonal con especificidad por la conformación de prefusión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 54, una región CDR2 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 55, una región CDR3 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 56, una región CDR1 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 62, una región CDR2 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 63 y una región CDR3 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 64 (que se conocerá de aquí en adelante como CR9501), y/o que puede ser reconocido por anticuerpo monoclonal con especificidad por la conformación de prefusión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 58, una región CDR2 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 59, una región CDR3 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 60, una región CDR1 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 66, una región CDR2 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 67 y una región CDR3 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 68 (que en la presente se conoce como CR9502). CR9501 y CR9502 representan las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana, respectivamente, por lo que los anticuerpos 58C5 y 30D8 solamente han de poder unirse de manera específica a la proteína F del RSV en su conformación de prefusión, y no en su conformación posterior a la fusión (véase WO2012/006596).

40 En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV recombinantes comprenden al menos un epitope que puede ser reconocido por al menos un anticuerpo monoclonal que presenta especificidad por la conformación de prefusión, que puede ser como se describió con anterioridad, y son triméricos.

Los polipéptidos F de prefusión del RSV estables de acuerdo con la invención presentan una mutación en el residuo de aminoácido N o T en la posición 67 y/o una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 215.

45 En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV estables de acuerdo con la invención comprenden un dominio F1, un dominio F2 y una secuencia de conexión entre el dominio F1 y el dominio F2 que comprende entre 1 y 10 residuos de aminoácidos, y también presentan una mutación en el residuo de aminoácido N o T en la posición 67 y/o una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 215.

50 En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV estables de acuerdo con la invención comprenden un dominio F1 truncado, un dominio F2 y una secuencia de conexión entre el dominio F1 y el dominio F2 que comprende entre 1 y 10 residuos de aminoácidos, y también presentan una mutación en el residuo de aminoácido N o T en la posición 67 y/o una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 215.

En este contexto, los polipéptidos de acuerdo con la invención presentan al menos una mutación de estabilización en el dominio F1 y/o en el dominio F2, en comparación con el dominio F1 y/o el dominio F2 de una proteína F del RSV salvaje.

55 De acuerdo con la invención, los polipéptidos F de prefusión del RSV comprenden una mutación en el residuo de aminoácido N o T en la posición 67 (N/T67I) por un residuo de I y/o una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 215 por un residuo de P (S215P).

Se sabe que el RSV toma la forma de un único serotipo, que a su vez puede dividirse en dos subgrupos antigénicos: A y B. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas F maduras procesadas presentan una identidad de aproximadamente 93%. En el contexto de esta solicitud, las posiciones de los aminoácidos se expresan con relación a

la secuencia de la proteína F del RSV de la cepa A2 (SEQ ID N° 1). Tal como se lo emplea en la presente, el término “posición x”, aplicado a un residuo de aminoácido en la proteína F del RSV, hace referencia a un aminoácido que se encuentra en la posición x de la proteína F del RSV de la cepa A2, cuya secuencia se representa en SEQ ID N° 1. En el sistema de numeración que se emplea en esta solicitud, el número 1 hace referencia al aminoácido que se encuentra en el extremo N de la proteína inmadura F0 (SEQ ID N° 1). Por lo tanto, cuando se emplea una cepa del RSV que es diferente de la cepa A2, las posiciones en las que se encuentran los aminoácidos en la proteína F se numeran con relación a las posiciones en la proteína F de la cepa A2, cuya secuencia se representa en SEQ ID N° 1, para lo cual se alinea la secuencia de la proteína F de la cepa del RSV que no es la cepa A2 con la secuencia de la proteína F que se representa en SEQ ID N° 1, con la inserción de los espacios necesarios para las faltas de coincidencia. El alineamiento de las secuencias puede llevarse a cabo con diversos métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, con los programas CLUSTALW, Bioedit o CLC Workbench.

En el contexto de la invención, un aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural (que también se conoce como un aminoácido “convencional”) o una variante de un aminoácido de origen natural, como es el caso de los D-aminoácidos (los enantiómeros D de los aminoácidos que presentan un centro quiral) o las variantes que no se encuentran de manera natural en las proteínas, tales como la norleucina. Los aminoácidos convencionales pueden clasificarse en diversos grupos en función de sus propiedades. Los factores más importantes para determinar la estructura de las proteínas y las interacciones entre las proteínas incluyen la carga, la hidrofiliidad, la hidrofobicidad, el tamaño y los grupos funcionales. Algunos aminoácidos presentan propiedades especiales, como es el caso de la cisteína, que puede formar enlaces covalentes disulfuro con otros residuos de cisteína, la prolina, que puede dar como resultado giros en el esqueleto de un polipéptido, o la glicina, que es más flexible que otros aminoácidos. En la tabla 11 se representan las abreviaturas y las propiedades de los aminoácidos convencionales.

Aquellos versados en la técnica han de apreciar que las mutaciones pueden introducirse en las proteínas de acuerdo con procedimientos convencionales de biología molecular. Las mutaciones de acuerdo con la invención preferiblemente dan como resultado un incremento en el nivel de expresión y/o la estabilidad de los polipéptidos F de prefusión del RSV, en comparación con los polipéptidos F del RSV que no las presentan.

En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV son solubles.

En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV también comprenden un dominio de trimerización heterólogo conectado con el dominio F1 truncado. De acuerdo con la invención, se ha comprobado que cuando se conecta un dominio de trimerización heterólogo con el residuo de aminoácido que se encuentra en el extremo C de un dominio F1 truncado, y cuando opcionalmente se combina el producto resultante con una secuencia de conexión entre el dominio F1 y el dominio F2 y se ponen en práctica una o más mutaciones de estabilización, pueden obtenerse polipéptidos F del RSV que pueden expresarse en una medida notable y que pueden unirse a los anticuerpos con especificidad por la conformación de prefusión, en función de lo cual puede concluirse que los polipéptidos presentan una conformación de prefusión. Por otro lado, estos polipéptidos F del RSV se encuentran estabilizados en la conformación de prefusión, por lo que, incluso después de ser procesados, pueden unirse a los anticuerpos con especificidad por la conformación de prefusión CR9501 y/o CR9502, en función de lo cual puede concluirse que se conservan los epitopes propios de la conformación de prefusión.

En otras formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV comprenden una o más mutaciones adicionales (en comparación con la proteína F salvaje del RSV) que se seleccionan del grupo que consiste en

- (a) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 46,
- (b) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 77,
- (c) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 80,
- (d) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 92,
- (e) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 175,
- (f) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 184,
- (g) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 185,
- (h) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 201,
- (i) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 209,
- (j) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 421,
- (k) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 426,
- (l) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 465,

ES 2 715 378 T3

- (m) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 486,
- (n) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 487 y
- (o) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 508.

En formas de realización preferidas, las una o más mutaciones adicionales se seleccionan del grupo que consiste en

- 5 (a) una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 46 por un residuo de G (S46G),
- (b) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 77 por un residuo de E (K77E),
- (c) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 80 por un residuo de E (K80E),
- (d) una mutación en el residuo de aminoácido E en la posición 92 por un residuo de D (E92D),
- (e) una mutación en el residuo de aminoácido N en la posición 175 por un residuo de P (N175P),
- 10 (f) una mutación en el residuo de aminoácido G en la posición 184 por un residuo de N (G184N),
- (g) una mutación en el residuo de aminoácido V en la posición 185 por un residuo de N (V185N),
- (h) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 201 por un residuo de Q (K201Q),
- (i) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 209 por un residuo de Q (K209Q),
- (j) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 421 por un residuo de N (K421N),
- 15 (k) una mutación en el residuo de aminoácido N en la posición 426 por un residuo de S (N426S),
- (l) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 465 por un residuo de E o de Q (K465Q),
- (m) una mutación en el residuo de aminoácido D en la posición 486 por un residuo de N (D486N),
- (n) una mutación en el residuo de aminoácido E en la posición 487 por un residuo de Q, de N o de I (E487Q/N/I) y
- (o) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 508 por un residuo de E (K508E).

20 Una vez más, vale destacar que las posiciones en las que se encuentran los residuos de aminoácidos se numeran con relación a las posiciones en SEQ ID N° 1. Aquellos versados en la técnica han de poder determinar la relación de correspondencia entre los residuos de aminoácidos en las proteínas F de otras cepas del RSV.

En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV comprenden al menos dos mutaciones (en comparación con la proteína F salvaje del RSV). En formas de realización preferidas, las al menos dos mutaciones abarcan una mutación en el residuo de aminoácido N o T en la posición 67 por un residuo de I (N/T67I) y una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 215 por un residuo de P (S215P).

25 En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV comprenden al menos una mutación adicional que se selecciona del grupo que consiste en

- (a) una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 46 por un residuo de G,
- 30 (b) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 77 por un residuo de E,
- (c) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 80 por un residuo de E,
- (d) una mutación en el residuo de aminoácido E en la posición 92 por un residuo de D,
- (e) una mutación en el residuo de aminoácido N en la posición 175 por un residuo de P,
- (f) una mutación en el residuo de aminoácido G en la posición 184 por un residuo de N,
- 35 (g) una mutación en el residuo de aminoácido V en la posición 185 por un residuo de N,
- (h) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 201 por un residuo de Q,
- (i) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 209 por un residuo de Q,
- (j) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 421 por un residuo de N,
- (k) una mutación en el residuo de aminoácido N en la posición 426 por un residuo de S,

- (l) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 465 por un residuo de E o Q,
- (m) una mutación en el residuo de aminoácido D en la posición 486 por un residuo de N,
- (n) una mutación en el residuo de aminoácido E en la posición 487 por un residuo de Q, de N o de I y
- (o) una mutación en el residuo de aminoácido K o R en la posición 508 por un residuo de E.

5 En determinadas formas de realización, los polipéptidos comprenden al menos tres mutaciones.

En determinadas formas de realización, el dominio de trimerización heterólogo comprende la secuencia de aminoácidos EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID N° 3). En otras formas de realización, el dominio de trimerización heterólogo comprende la secuencia de aminoácidos GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID N° 4).

10 Según se describió con anterioridad, en determinadas formas de realización, los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden un dominio F1 truncado. Tal como se lo emplea en la presente, el término “truncado”, aplicado a un dominio F1, hace referencia a un dominio F1 que no se encuentra completo, por lo que se trata de un dominio F1 de cuyo extremo N o C se han eliminado uno o más residuos de aminoácidos. De acuerdo con la invención, puede haberse suprimido al menos el dominio transmembrana y la cola citoplasmática para posibilitar la expresión como un ectodominio soluble.

15 En otras formas de realización, el dominio F1 se encuentra truncado después del residuo de aminoácido 495 de la proteína F del RSV (que se representa en SEQ ID N° 1), lo que implica que carece de la porción correspondiente al extremo C del dominio F1, que comienza en el residuo de aminoácido 496 (que se representa en SEQ ID N° 1). En otras formas de realización, el dominio F1 se encuentra truncado después del residuo de aminoácido 513 de la proteína F del RSV. En determinadas formas de realización, el dominio F1 se encuentra truncado después del residuo de aminoácido
20 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 525 o 525.

En determinadas formas de realización, el dominio de trimerización está unido al residuo de aminoácido 495 del dominio F1 de la proteína F del RSV. En determinadas formas de realización, el dominio de trimerización es como el que se representa en SEQ ID N° 4 y está unido al residuo de aminoácido 495 del dominio F1 de la proteína F del RSV.

25 En otras formas de realización, el dominio de trimerización está unido al residuo de aminoácido 513 del dominio F1 de la proteína F del RSV. En determinadas formas de realización, el dominio de trimerización es como el que se representa en SEQ ID N° 3 y está unido al residuo de aminoácido 513 del dominio F1 de la proteína F del RSV.

30 En determinadas formas de realización, el dominio F1, que puede estar truncado, y el dominio F2 se encuentran unidos por una secuencia de conexión, que más precisamente se halla entre el aminoácido que se encuentra en el extremo C del dominio F2 y el aminoácido que se encuentra en el extremo N del dominio F1 (que puede estar truncado). En determinadas formas de realización, la secuencia de conexión (que también puede conocerse como conector) comprende entre 1 y 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente comprende entre 2 y 9 residuos de aminoácidos, más preferiblemente comprende entre 3 y 8 residuos de aminoácidos, aun más preferiblemente comprende entre 4 y 7
35 residuos de aminoácidos, e incluso más preferiblemente comprende 5 o 6 residuos de aminoácidos. En la técnica se conocen numerosos conectores que presentan una conformación neutra, que pueden resultar útiles en el contexto de la presente invención y que no pueden provocar alteraciones en la conformación de los polipéptidos F del RSV. En formas de realización preferidas, el conector comprende la secuencia de aminoácidos GSGSG (SEQ ID N° 5).

40 En determinadas formas de realización, el dominio F1 y/o el dominio F2 provienen de una cepa A del RSV. En determinadas formas de realización, el dominio F1 y/o el dominio F2 provienen de la cepa A2 del RSV y presentan una secuencia como la que se representa en SEQ ID N° 1.

En determinadas formas de realización, el dominio F1 y/o el dominio F2 provienen de una cepa A del RSV y presentan una secuencia como la que se representa en SEQ ID N° 69.

45 En determinadas formas de realización, el dominio F1 y/o el dominio F2 provienen de una cepa B del RSV. En determinadas formas de realización, el dominio F1 y/o el dominio F2 provienen de una cepa B del RSV y presentan una secuencia como la que se representa en SEQ ID N° 2.

En determinadas formas de realización, el dominio F1 y el dominio F2 provienen de una misma cepa del RSV. En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV son polipéptidos quiméricos, es decir, comprenden un dominio F1 y un dominio F2 que provienen de cepas diferentes del RSV.

50 En determinadas formas de realización, el nivel de expresión de los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención es mayor que el que presenta el ectodominio del polipéptido F del RSV salvaje, que carece de mutaciones (es decir, que carece de la región transmembrana y la región citoplasmática). En determinadas formas de realización, el nivel de expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención es al menos 5 veces, y preferiblemente es hasta 10 veces mayor que el de los polipéptidos salvajes. En determinadas formas de realización, el nivel de expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención es más de 10 veces mayor que el de los polipéptidos salvajes.

55 Los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención son estables, es decir, no adoptan una conformación posterior a la fusión en una proporción significativa cuando se los procesa, por ejemplo, cuando se los

purifica, cuando se los somete a varios ciclos de congelación y descongelación, cuando se los almacena o cuando se los somete a otros procedimientos.

5 En determinadas formas de realización, cuando se los almacena a 4°C, los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención presentan una estabilidad durante el almacenamiento que es superior a la de los polipéptidos F del RSV que carecen de mutaciones. En determinadas formas de realización, los polipéptidos son estables cuando se los almacena a 4°C durante al menos 30 días, preferiblemente durante al menos 60 días, más preferiblemente durante al menos 6 meses, y aun más preferiblemente durante al menos 1 año. El término “estables durante el almacenamiento”, tal como se lo emplea en la presente, aplicado a los polipéptidos de acuerdo con la invención, hace referencia a la conservación de al menos un epítopo propio de la conformación de prefusión, que puede reaccionar con el anticuerpo correspondiente (por ejemplo, CR9501), después de un almacenamiento en una solución (por ejemplo, en un medio de cultivo apropiado) a 4°C, durante al menos 30 días, lo cual puede determinarse, por ejemplo, con cualquiera de los métodos que se describen en los ejemplos 7 y 9. En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención presentan al menos un epítopo propio de la conformación de prefusión durante al menos 6 meses, preferiblemente durante al menos 1 año, cuando se los almacena a 4°C.

20 En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención presentan una estabilidad ante el calor que es superior a la de los polipéptidos F del RSV que carecen de mutaciones. En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV son estables durante al menos 30 minutos cuando se los expone a una temperatura de 55°C, preferiblemente a una temperatura de 58°C, y más preferiblemente a una temperatura de 60°C. El término “estables ante el calor” tal como se lo emplea en la presente, aplicado a los polipéptidos de acuerdo con la invención, hace referencia a la conservación de al menos un epítopo propio de la conformación de prefusión después de una exposición a una temperatura elevada (es decir, a una temperatura de 55°C o más) durante al menos 30 minutos, lo cual puede determinarse, por ejemplo, con el método que se describe en el ejemplo 6.

25 En determinadas formas de realización, los polipéptidos presentan al menos un epítopo propio de la conformación de prefusión después de someterlos a entre 1 y 6 ciclos de congelación y descongelación en un amortiguador de formulación apropiado.

30 En determinadas formas de realización preferidas, los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 21 a 52 y SEQ ID N° 71 a 89. En determinadas formas de realización, los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 21 a 52 y SEQ ID N° 71 a 89.

35 En el contexto de la presente invención, las secuencias de nucleótidos se detallan desde el extremo 5' hasta el extremo 3', mientras que las secuencias de aminoácidos se detallan desde el extremo N hasta el extremo C, de acuerdo con la práctica habitual en la técnica.

40 En determinadas formas de realización, los polipéptidos codificados de acuerdo con la invención también comprenden una secuencia directriz, que también se conoce en la presente como una secuencia señal o un péptido señal, que corresponde a los aminoácidos 1 a 26 de SEQ ID N° 1, de SEQ ID N° 2 o de SEQ ID N° 69. Se trata de un péptido corto (que típicamente tiene una longitud de entre 5 y 30 aminoácidos) que suele estar presente en el extremo N de la mayor parte de las proteínas que han sido sintetizadas recientemente y que tienen por destino la vía de secreción. En determinadas formas de realización, los polipéptidos de acuerdo con la invención no comprenden una secuencia directriz.

45 En determinadas formas de realización, los polipéptidos comprenden una marca de His. Una marca de His o una marca de polihistidina es un motivo de aminoácidos en las proteínas que consiste en al menos cinco residuos de histidina (H), que suelen colocarse en el extremo N o C de una proteína y que suelen resultar útiles para purificarla.

En determinadas formas de realización, los polipéptidos no comprenden una marca de His. De acuerdo con la invención, se ha demostrado que cuando se eliminan las marcas de His, puede obtenerse un nivel de expresión y una estabilidad sorprendentemente superiores a los que suelen presentar los polipéptidos que comprenden marcas de His.

50 En la presente también se proveen moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos F del RSV de acuerdo con la invención.

55 En formas de realización preferidas, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de acuerdo con la invención han sido sometidas a una optimización a nivel de los codones para poder expresarlas en las células de mamíferos, y preferiblemente en las células humanas. Se conocen diversos métodos apropiados para poner en práctica la optimización a nivel de los codones, que han sido descritos con anterioridad (por ejemplo, en WO 96/09378). Se considera que una secuencia ha sido sometida a una optimización a nivel de los codones si en ella se ha reemplazado al menos un codón no preferido propio de la secuencia salvaje por un codón más preferible. En la presente, un codón no preferido es un codón que es usado con menor frecuencia en un organismo que otro codón que codifica el mismo aminoácido, y un codón más preferible es un codón que es usado con mayor frecuencia en un organismo que un codón

no preferido. La frecuencia del uso de los codones en diversos organismos puede hallarse en tablas publicadas, por ejemplo, en <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Preferiblemente, se reemplaza más de un codón no preferido, y más preferiblemente se reemplaza la mayoría o la totalidad de los codones no preferidos por codones más preferibles. Preferiblemente, cuando se somete una secuencia a una optimización a nivel de los codones, se emplean los codones que son usados con mayor frecuencia en el organismo en cuestión. En general, el reemplazo por codones preferidos da como resultado un incremento en la expresión.

Aquellos versados en la técnica han de comprender que diversos polinucleótidos y diversas moléculas de ácidos nucleicos pueden codificar polipéptidos idénticos, como resultado de la degeneración del código genético. Aquellos versados en la técnica también han de comprender que, mediante el uso de procedimientos de rutina, ha de ser posible realizar sustituciones a nivel de los nucleótidos que no afecten las secuencias de los polipéptidos codificados por las moléculas de ácidos nucleicos, de manera tal de reflejar el uso de codones del organismo que se emplee como huésped para expresar los polipéptidos. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, el término “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” hace referencia a todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de las secuencias de referencia y que codifican secuencias de aminoácidos idénticas. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas o ARN pueden comprender o no intrones.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden clonarse con procedimientos convencionales de biología molecular o pueden generarse de novo, por medio de procedimientos de síntesis de ADN, los cuales pueden encargarse en compañías establecidas en el ámbito de la síntesis del ADN y/o de la clonación molecular (tales como GeneArt, GenScripts, Invitrogen o Eurofins).

En la invención también se proveen vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos como las que se describieron con anterioridad. En determinadas formas de realización, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención forma parte de un vector. Los vectores de este tipo pueden manipularse con facilidad mediante el uso de métodos bien conocidos por aquellos versados en la técnica, y por ejemplo, pueden diseñarse de manera tal que puedan replicarse en las células procariotas y/o en las células eucariotas. Por otro lado, numerosos vectores pueden resultar útiles para transformar las células eucariotas y han de poder integrarse de manera total o parcial en su genoma, de modo tal de generar células huésped estables que comprendan los ácidos nucleicos deseados en su genoma. El vector usado podrá ser cualquier vector que resulte apropiado para clonar el ADN y que pueda ser útil para transcribir un ácido nucleico de interés. Los vectores apropiados para poner en práctica la invención incluyen, por ejemplo, los adenovectores, tales como Ad26 o Ad35, los alfavirus, los paramixovirus, los virus de la viruela, los virus del herpes y los vectores retrovirales. Aquellos versados en la técnica han de poder seleccionar los vectores apropiados para poner en práctica la expresión y han de poder insertar las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención de una manera funcional.

Las células huésped que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos F de prefusión del RSV también forman parte de la invención. Los polipéptidos F de prefusión del RSV pueden producirse con procedimientos relacionados con la recombinación del ADN, que pueden estar basados en la expresión de las moléculas deseadas en las células huésped, que por ejemplo, pueden ser células de ovario de hámster chino (CHO), células provenientes de diversas líneas de tumores, células BHK, células provenientes de diversas líneas de origen humano, tales como las células HEK293 o las células PER.C6, o células de levadura, células de origen fúngico, células provenientes de insectos, células provenientes de plantas transgénicas o células provenientes de animales transgénicos. En determinadas formas de realización, las células provienen de un organismo multicelular. En determinadas formas de realización, las células provienen de un animal vertebrado o de un animal invertebrado. En determinadas formas de realización, las células provienen de un mamífero. En determinadas formas de realización, las células provienen del ser humano. En general, para producir una proteína recombinante en una célula huésped, tal como los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, puede introducirse en la célula huésped una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica el polipéptido en cuestión, en un formato que puede expresarse, y puede cultivarse la célula bajo condiciones apropiadas para expresar la molécula de ácido nucleico y para posibilitar la expresión del polipéptido en la célula. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína y que adopta un formato que puede expresarse puede tomar la forma de un casete de expresión. En este contexto, los casetes de expresión también suelen comprender otras secuencias que son necesarias para llevar a cabo la expresión del ácido nucleico deseado, como es el caso de los potenciadores, los promotores o las señales de poliadenilación, entre otras. Aquellos versados en la técnica han de conocer diversos promotores apropiados para efectuar la expresión de los genes deseados en las células huésped correspondientes. Los promotores pueden ser constitutivos o pueden estar regulados, y pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como los virus, las células procariotas o las células eucariotas, o pueden diseñarse por medios artificiales.

Los medios para cultivar las células pueden obtenerse en diversos proveedores comerciales, y la selección del medio de cultivo apropiado ha de realizarse en función de la naturaleza de la célula huésped donde se desee expresar la proteína interés, que en este caso puede ser cualquiera de los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención. El medio de cultivo puede comprender o no suero.

El término “molécula de ácido nucleico heteróloga” (que puede usarse como sinónimo del término “transgen”) hace referencia a una molécula de ácido nucleico que no se encuentra presente de manera natural en una célula huésped. A modo de ejemplo, puede introducirse mediante el uso de un vector, de acuerdo con procedimientos convencionales de

biología molecular. Un transgen generalmente está unido operativamente a secuencias de control que son apropiadas para efectuar la expresión, lo cual puede ser el resultado de la introducción de los ácidos nucleicos que codifican los uno o más transgenes bajo el control de promotores apropiados y de la adición eventual de otras secuencias reguladoras. Ha de ser posible emplear una variedad de promotores conocidos por aquellos versados en la técnica para llevar a cabo la expresión de los transgenes deseados, como es el caso de los promotores de origen viral, los promotores provenientes de los mamíferos o los promotores sintéticos, entre otros. A modo de ejemplo no limitativo, un promotor apropiado para efectuar la expresión en las células eucariotas puede ser un promotor proveniente del CMV (US 5385839), tal como el promotor temprano inmediato del CMV, que puede encontrarse entre los nucleótidos -735 y +95 del gen que codifica el potenciador/promotor temprano inmediato del CMV. Hacia el extremo 5' de los transgenes, puede haber una señal de poliadenilación apropiada, tal como la señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina (US 5122458). Como alternativa, pueden usarse diversos vectores de expresión de uso habitual en la técnica, que pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes comerciales, tales como las series de vectores pcDNA o pEF, de Invitrogen, las series de vectores pMSCV o pTK-Hyg, de BD Sciences, o el vector pCMV-Script, de Stratagene, para llevar a cabo la expresión recombinante de las proteínas de interés o para obtener otros promotores, otras secuencias de terminación, otras secuencias de poliA u otros componentes apropiados.

Las células en un cultivo pueden adoptar cualquier forma apropiada, como es el caso de las células adherentes, en cuyo caso, por ejemplo, la adhesión puede tener lugar con la superficie del recipiente donde se realiza el cultivo, las células asociadas a microvehículos o las células en suspensión. La mayoría de los cultivos en suspensión a gran escala son procesos operados en lotes en general o en lotes intermitentes, a causa de su sencillez y su versatilidad. En la actualidad, se están empleando con una frecuencia mayor los procesos continuos basados en principios de perfusión, que también pueden resultar apropiados. Aquellos versados en la técnica también han de conocer medios apropiados para poner en práctica los cultivos, que generalmente pueden obtenerse a partir de proveedores comerciales en grandes cantidades, o bien pueden elaborarse a medida, de acuerdo con protocolos convencionales. El cultivo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en placas, en botellas o en biorreactores, según se ha indicado, en operaciones por lotes en general, en lotes intermitentes o continuas, entre otras posibilidades. Aquellos versados en la técnica han de conocer las condiciones apropiadas para cultivar las células (véase, por ejemplo, *Tissue Culture*, Academic Press, editado por Kruse y Paterson (1973), y R. I. Freshney, *Culture of animal cells: A manual of basic technique*, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9)).

En la invención también se proveen composiciones que comprenden un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico que lo codifica y/o un vector que comprende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como los que se han mencionado, todos los cuales pueden ser como se los describió con anterioridad. En particular, en la invención se proveen composiciones que comprenden un polipéptido F de prefusión del RSV que comprende un epítipo propio de la conformación de prefusión de la proteína F del RSV, que no puede hallarse en la conformación posterior a la fusión. En la invención también se proveen composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico y/o un vector que codifica un polipéptido F de prefusión del RSV como los que se describen en la presente. En la invención también se proveen composiciones inmunogénicas que comprenden un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico que lo codifica y/o un vector que comprende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como los que se han mencionado, todos los cuales pueden ser como se los describió con anterioridad. En la invención también se provee el uso de un polipéptido F de prefusión del RSV estabilizado, de una molécula de ácido nucleico que lo codifica y/o de un vector que comprende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como los que se han mencionado, todos los cuales pueden ser como se los describió con anterioridad, en la inducción de una respuesta inmune contra la proteína F del RSV en un sujeto. Por otro lado, se proveen polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, moléculas de ácidos nucleicos que los codifican y/o vectores que comprenden polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos como los que se han mencionado, que pueden ser útiles para inducir una respuesta inmune contra la proteína F del RSV en un sujeto. Adicionalmente, se provee el uso de los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, de las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican y/o de los vectores que comprenden polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos como los que se han mencionado en la manufactura de medicamentos útiles para inducir una respuesta inmune contra la proteína F del RSV en un sujeto.

Los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican y/o los vectores que comprenden polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos como los que se han mencionado pueden ser útiles para prevenir y/o tratar las infecciones del RSV. En determinadas formas de realización, la prevención y/o el tratamiento pueden ponerse en práctica en grupos de pacientes susceptibles a las infecciones del RSV. Entre los ejemplos no limitativos de los grupos de pacientes que pueden ser tratados de acuerdo con la invención, pueden mencionarse los pacientes de edad avanzada (lo que abarca, por ejemplo, una edad de 50 años o más o una edad de 60 años o más, y preferiblemente una edad de 65 años o más), los pacientes jóvenes (lo que abarca, por ejemplo, una edad de 5 años o menos o una edad de 1 año o menos), los pacientes hospitalizados y los pacientes que ya han sido tratados con un compuesto antiviral pero que no han desarrollado una respuesta apropiada.

A modo de ejemplo, los polipéptidos F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican y/o los vectores que comprenden polipéptidos o moléculas de ácidos nucleicos como los que se han mencionado pueden usarse de manera individual para tratar y/o prevenir una enfermedad o una afección provocada por el RSV, o bien pueden usarse en combinación con otros compuestos apropiados para poner en práctica

un protocolo profiláctico y/o terapéutico, como es el caso de las vacunas, los agentes antivirales y/o los anticuerpos monoclonales (existentes o futuros).

El término “cantidad eficaz para el uso terapéutico” hace referencia a una cantidad de un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, de una molécula de ácido nucleico que lo codifica y/o de un vector que comprende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como los que se han mencionado que es eficaz para prevenir, mejorar y/o tratar una enfermedad o una afección asociada a una infección del RSV. La prevención puede estar relacionada con la inhibición o la disminución de la dispersión RSV o con la inhibición o la demora del inicio, el desarrollo o el progreso de uno o más de los síntomas propios de una infección de la RSV. La mejora puede estar relacionada con la disminución de los síntomas visibles o perceptibles de una enfermedad, de la viremia o de cualquier otra manifestación mensurable.

Para poner en práctica la administración en los sujetos que lo necesitan, que pueden ser pacientes humanos, en el contexto de la invención pueden emplearse composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico que lo codifica y/o un vector que comprende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como los que se han mencionado, así como un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable. En este contexto, el término “farmacéuticamente aceptable” denota que el vehículo o el excipiente, en las dosis y las concentraciones que se empleen, no darán como resultado efectos indeseables o dañinos en los sujetos que los reciban. Los vehículos y los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, editado por A. R. Gennaro, Mack Publishing Company (1990), Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, editado por S. Frokjaer y L. Hovgaard, Taylor & Francis (2000), y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, editado por A. Kibbe, Pharmaceutical Press (2000)). Los polipéptidos F del RSV o las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican preferiblemente se formulan y se administran en forma de soluciones estériles, aunque también pueden emplearse preparaciones liofilizadas. Las soluciones estériles suelen prepararse sobre la base de una filtración bajo condiciones estériles o con otros métodos conocidos en la técnica. Posteriormente, las soluciones pueden liofilizarse o colocarse en recipientes apropiados. El pH de estas soluciones generalmente se encuentra en el rango de entre 3.0 y 9.5, por ejemplo, entre 5.0 y 7.5. Los polipéptidos F del RSV típicamente se administran en forma de soluciones que comprenden amortiguadores farmacéuticamente aceptables, y que también pueden comprender sales o agentes estabilizadores como la albúmina. En determinadas formas de realización, se agrega un detergente. En determinadas formas de realización, los polipéptidos F del RSV pueden formularse en preparaciones inyectables.

En determinadas formas de realización, una composición de acuerdo con la invención también comprende uno o más coadyuvantes. En este contexto, los coadyuvantes son sustancias conocidas en la técnica que resultan útiles para potenciar la respuesta inmune contra un determinante antigénico en particular. Los “coadyuvante” y “estimulante inmune” se emplean como sinónimos en la presente y hacen referencia a una o más sustancias que son útiles para estimular el sistema inmune, por lo que, de acuerdo con la invención, un coadyuvante puede ser útil para potenciar la respuesta inmune contra los polipéptidos F del RSV de acuerdo con la invención. Entre los ejemplos de los coadyuvantes apropiados para poner en práctica la invención, pueden mencionarse las sales de aluminio, tales como el hidróxido de aluminio y/o el fosfato de aluminio, las composiciones del tipo de las emulsiones oleosas (que también se conocen como emulsiones de aceite en agua), que abarcan las emulsiones de escualeno en agua, tales como MF59 (véase, por ejemplo, WO 90/14837), las formulaciones de saponina, tales como QS21 o los complejos de inmunoestimulación (ISCOMS; véase, por ejemplo, US 5057540, WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762 o WO 2005/002620), los derivados de origen bacteriano o microbiano, tales como el lípido de monofosforilo A (MPL), el MPL 3-O-desacilado (3dMPL), los oligonucleótidos que comprenden motivos de CpG, las toxinas bacterianas que pueden ribosilar el ADP o sus variantes mutadas, tales como la enterotoxina lábil ante el calor LT de E. coli o la toxina CT del cólera y las proteínas de origen eucariota (como es el caso de los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, que pueden estar dirigidos contra antígenos específicos o contra componentes como CD1a, CD3, CD7 o CD80, o los ligandos de receptores específicos, tales como CD40L, GMCSF o GCSF), que pueden ser útiles para estimular una respuesta inmune cuando interactúan con las células receptoras. En determinadas formas de realización, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden aluminio como coadyuvante, por ejemplo, en forma de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de potasio y aluminio o cualquier combinación de éstos, en una cantidad de entre 0.05 y 5 mg por dosis, por ejemplo, de entre 0.075 y 1.0 mg por dosis.

Los polipéptidos F de prefusión del RSV también pueden administrarse en combinación con nanopartículas o conjugados con nanopartículas, en cuyo caso pueden tomar la forma de polímeros, de liposomas, de virosomas o de partículas similares a los virus, entre otras posibilidades. Los polipéptidos F de prefusión pueden combinarse con las nanopartículas, pueden encapsularse en las nanopartículas o pueden conjugarse con las nanopartículas en presencia o ausencia de coadyuvantes. La encapsulación en liposomas se describe, por ejemplo, en US 4235877. La conjugación con macromoléculas se describe, por ejemplo, en US 4372945 y en US 4474757.

En otras formas de realización, las composiciones no comprenden coadyuvantes.

En determinadas formas de realización, en la invención se proveen métodos apropiados para elaborar vacunas contra el virus sincicial respiratorio (RSV), que comprenden proveer una composición de acuerdo con la invención y formularla de una manera farmacéuticamente aceptable. El término “vacuna” hace referencia a un agente o una composición que comprende un componente activo que es eficaz para conferirle a un sujeto un grado de inmunidad determinado ante un patógeno o una enfermedad en particular, que puede dar como resultado mínimo una disminución en la severidad, la

duración u otras características de los síntomas asociados a la infección provocada por el patógeno en cuestión o asociados a la enfermedad que se desea tratar (lo cual puede abarcar una anulación completa de los síntomas). En el contexto de la presente invención, una vacuna comprende una cantidad eficaz de un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la invención, de una molécula de ácido nucleico que lo codifica y/o de un vector que comprende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como los que se han mencionado, que es útil para estimular una respuesta inmune contra la proteína F del RSV. De esta manera, puede proveerse un método útil para prevenir las enfermedades severas en la porción inferior del tracto respiratorio, que pueden dar como resultado una hospitalización, para disminuir la frecuencia de las complicaciones de las infecciones del RSV, tales como la neumonía o la bronquiolitis, o para mermar la capacidad de replicación del RSV en los sujetos. Por otra parte, el término "vacuna", tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una composición farmacéutica que típicamente comprende al menos un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable, y que puede comprender ingredientes activos adicionales. En determinadas formas de realización, puede tratarse de una vacuna combinada, que puede comprender otros componentes apropiados para inducir una respuesta inmune, por ejemplo, contra otras proteínas del RSV y/o contra otros agentes infecciosos. A modo de ejemplo, la administración de los componentes activos adicionales puede realizarse por separado o de manera simultánea, mediante el uso de productos combinados.

Las composiciones pueden administrarse a sujetos como los pacientes humanos. La dosis total de los polipéptidos F del RSV en una composición que puede administrarse en una sola ocasión puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 0.01 µg y aproximadamente 10 mg, de entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 1 mg o de entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 100 µg. Aquellos versados en la técnica han de saber cómo determinar la dosis recomendable, sobre la base de procedimientos experimentales de rutina.

La administración de las composiciones de acuerdo con la invención puede efectuarse a través de una variedad de vías convencionales, entre las que puede mencionarse a modo de ejemplo no limitativo la administración parenteral, que abarca la administración intradérmica, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración transcutánea y la administración a través de las mucosas, como es el caso de la administración intranasal o la administración oral. En una forma de realización, una composición se administra por medio de una inyección intramuscular. Aquellos versados en la técnica han de conocer diversos medios para administrar una composición, por ejemplo, mediante el uso de una vacuna, con el propósito de inducir una respuesta inmune contra uno o más antígenos.

En el contexto de la presente invención, un sujeto preferiblemente es un mamífero, tal como un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata, un primate no humano o un ser humano. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano.

Los polipéptidos, las moléculas de ácidos nucleicos, los vectores y/o las composiciones de acuerdo con la invención también pueden administrarse a través de vacunaciones iniciales o de refuerzo, en regímenes homólogos o heterólogos. Si se emplea una vacunación de refuerzo, la aplicación típicamente se realiza entre una semana y un año después de la administración de la composición inicial (que puede conocerse como la "vacunación inicial"), y preferiblemente se realiza entre dos semanas y cuatro meses después de la vacunación inicial. En determinadas formas de realización, se recurre a una administración inicial y a al menos una administración de refuerzo.

Por otro lado, los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden usarse como herramientas de diagnóstico, por ejemplo, para analizar el estado del sistema inmune de un individuo, para lo cual puede comprobarse si hay anticuerpos que pueden unirse a los polipéptidos de acuerdo con la invención en el suero de dicho individuo. En este contexto, la invención también se relaciona con un método de diagnóstico in vitro que es útil para detectar la presencia de una infección del RSV en un paciente, que comprende (a) poner en contacto una muestra biológica proveniente del paciente con un polipéptido de acuerdo con la invención y (b) detectar la presencia de complejos compuestos por el anticuerpo y el polipéptido.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Preparación de polipéptidos F de prefusión del RSV estables: conectores y dominios de trimerización

En la investigación que condujo a la presente invención, se diseñaron variantes estabilizadas de la proteína F de prefusión soluble (sF) por estabilización de las dos regiones principales que inician el replegamiento. La primera estrategia fue detener al péptido de fusión en su posición y evitar que fuera liberado de la región de cabeza por fijación y unión de los dominios F1-F2 mediante un bucle corto. Se puede impedir la liberación del péptido de fusión reestableciendo una unión covalente entre el extremo N-terminal de F1 y el extremo C-terminal de F2. Según se muestra en este ejemplo, se probaron varios conectores diferentes. La inserción de un bucle de 5 aminoácidos entre F1 y F2, que comprende en particular la secuencia de aminoácidos GSGG (SEQ ID N°: 5), era la más exitosa. Este conector se diseñó basado en las distancias medidas en un modelo de homología 3D que fue generado para el tipo A2 de RSV-F basado en la alineación de secuencias con la secuencia F del tipo 5 de parainfluenza cuya estructura 3D ya fue publicada (Yin et. al., 2006).

ES 2 715 378 T3

AAA47881PIV5 -----MGTIIQFLVVSCLLAGAGSLDPAALMQIGVIPTNVRQLMYYTEASSA
FUS_HRSV1B -----MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYT
ACO83301HRSVA2ref -----MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYT
 .:* *.. : :.. . : * ... : . :

AAA47881PIV5 FIVVKLMPIDSPISGCNI--TSISSYNATVTKLLQPIGENLETIRNQLIP--TRRRRR-
FUS_HRSV1B SVITIELSNIKET--KCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRAREAP
ACO83301HRSVA2ref SVITIELSNIKKN--KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELP
 :.. :..*.. ** :.. : : * :.. * :.. . **.

AAA47881PIV5 -----FAGVVI GLAALGVATAAQVTA AVALVKANENAAA I LNLKNAIQ
FUS_HRSV1B QYMNVTINTTKNLNVSISKRRKRFLGFLGVSIAI ASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALL
ACO83301HRSVA2ref RFMNYTLNNAKKTNVTLSKRRKRFLGFLGVSIAI ASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALL
 : : : : : : : : : : * . . : : * . *

AAA47881PIV5 KTNAAVADVQATQSLGTAVQAVQDHINSVVSPAITAANCKAQDAIIGSILNLYLTELTT
FUS_HRSV1B STNKAVVLSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLL
ACO83301HRSVA2ref STNKAVVLSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL
 .* * .. : : * : * : : : * : . * : . : : * .. *

AAA47881PIV5 IFHNQITNP-ALSPITIQALRILGSLTPTVVEKSFNTQISAAELLSSGLLTGQIVGLDL
FUS_HRSV1B ITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNVQIVRQQSYSIMSII
ACO83301HRSVA2ref ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNVQIVRQQSYSIMSII
 * : : . * . . : * : : * : . : : : : . : . : . : :

AAA47881PIV5 TYMQMVIKIELPTLTVPATQIIDLATISAFI--NNQEVMAQL--PTRVMVTG--SLIQA
FUS_HRSV1B KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFF
ACO83301HRSVA2ref KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFF
 . : . : ** * : . : . : . : . : . * :

AAA47881PIV5 YPASQCTITPNTVYCRYNDAQVLSDDTMAQLGN---LTRCTFSPVVGSLTRFVLDGI
FUS_HRSV1B PQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLG-
ACO83301HRSVA2ref PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLG-
 * . * . : * * * : : . * . . . * . : . . : : * :

ES 2 715 378 T3

```

AAA47881PIV5      VYANCRS-MLCKCMQPAAVILQPSSSPVTVIDMYKCVSLQLDNLRFITITQLANVTYNSTI
FUS_HRSV1B       AIVSCYGKTKCTASKNKNGRIIKTFPNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKG
ACO83301HRSVA2ref AIVSCYGKTKCTASKNKNGRIIKTFPNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKG
                  . . . * . * . . : * . . * . . : . . : . . . * : . . . .
                  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

AAA47881PIV5      KLESS--QILSIDPLDISQNLAAVNKSLSDALQHLAQSDTYLSAITSATTTT--VLSIIA
FUS_HRSV1B       EPIINYYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVTGKSTTNIMITTI
ACO83301HRSVA2ref EPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELLHNVAVKSTTNIMITTI
                  : . . : * : . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
                  : . . : * : . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

AAA47881PIV5      ICLGSLGLILIIILLSVVVWKLITIVVANRNRMENFVYHK-----
FUS_HRSV1B       IVIIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIASF-----
ACO83301HRSVA2ref IVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIAFS-----
                  * : : * ** : :: * . *: : . : :

```

Alineación entre la secuencia F de los tipos A y B del HRSV con la secuencia PIV5 (secuencia superior) que se usó para la construcción del modelo de homología de prefusión de RSV-F

- 5 La otra región inestable es la segunda región de repetición de heptada (HRB) que forma la región de tallo helicoidal trimérica en la proteína F de prefusión. La supresión del dominio transmembrana (TM) en la proteína F soluble desestabiliza aún más a esta región, que se compensó por la adición de diferentes dominios de trimerización heterólogos. El ectodominio de RSV-F maduro completamente procesado se fusionó por el extremo C-terminal a diferentes dominios de trimerización y en distintas posiciones (es decir, el dominio F1 se truncó en diferentes residuos de aminoácidos).
- 10

Se obtuvieron varias construcciones basado en las cepas A2 o B1 del RSV. Se ligaron diferentes dominios de trimerización al dominio F1 del RSV, que se truncó en diferentes posiciones. Los dominios de trimerización que fueron evaluados incluyeron el motivo de Fibrina (que comprende la secuencia de aminoácidos: GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID N°: 4), y el motivo "Fibrina largo", un dominio de Fibrina más largo, extendido por el extremo N-terminal que incluye sus regiones helicoidales naturales (que comprenden la secuencia de aminoácidos: SSLQGDVQALQEAGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID N°: 6), que se agregaron al dominio F1 del RSV en marco (en registro) con la repetición de heptada presumible de la región HRB.

15

Otras construcciones que se elaboraron comprendieron los bucles superenrollados triméricos helicoidales ideales de heptada o los dominios de cierre de isoleucina (IZ) (Suzuki et al., Protein Engineering 11: 1051-1055 (1998)), que comprenden la secuencia de aminoácidos: IEAIEKK (SEQ ID N°: 7). De acuerdo con la invención, se usaron diferentes dominios IZ, conocidos como cierre de isoleucina (L), que comprenden la secuencia de aminoácidos: (I)EKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEAIEKKIEA (SEQ ID N°: 8) y el cierre de isoleucina (S), que comprende la secuencia de aminoácidos EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID N°: 3).

20

Estos dominios IZ son comparables en cuanto a estructura a GCN4, pero sin embargo, los dominios IZ no son secuencias naturales sino que fueron diseñadas para que sean dominios óptimos de trimerización y por ello más estables.

25

Se obtuvieron otras construcciones con otros dominios de trimerización conocidos:

GCN4II

EDKIEEILSKIYHIENEIARIKLLIGEA (SEQ ID N°: 9)

- 30 GCN4II optimizada

EDKVEELLSKIYHIENRIARIEKLVGEA (SEQ ID N°: 10)

Matrilina -1 (versión larga)

EEDPCECKSIVKFQTKVEELINTLQQKLEAVAKRIEALLENKII (SEQ ID N°: 11)

Matrillina- 1 versión corta que solamente contiene un dominio de cierre:

EELINTLQQKLEAVAKRIEALLENKII (SEQ ID N°: 12)

Se obtuvieron las siguientes construcciones:

5 La construcción F18 comprendía el dominio de trimerización de Fibrina (SEQ ID N°: 4) unido al residuo de aminoácido 513 del dominio F1.

La construcción F19 comprendía el dominio de trimerización de Fibrina (SEQ ID N°: 4) unido al residuo de aminoácido 499 del dominio F1.

10 La construcción F20 comprendía el dominio de cierre de isoleucina (L) (SEQ ID N°: 8) unido al residuo de aminoácido 516 del dominio F1 y que comprende modificaciones adicionales en HRB para optimizar la naturaleza hidrofóbica de las posiciones de heptada y facilita la fusión en-marco con el dominio IZ.

La construcción F21 también comprendía el dominio de cierre de isoleucina (L) (SEQ ID N°: 8), pero unido al residuo de aminoácido 501 del dominio F1 y sin modificaciones adicional en la región HRB.

15 La construcción F22 comprendía el dominio de cierre de isoleucina (L) (SEQ ID N°: 8) unido al residuo de aminoácido 495 del dominio F1 y que comprende modificaciones adicionales en HRB.

La construcción F23 comprendía el dominio de cierre de isoleucina (S) (SEQ ID N°: 3) unido al residuo de aminoácido 495.

20 La construcción F46 también comprendía al dominio de cierre de isoleucina (S) (SEQ ID N°: 3) pero unido a un ectodominio RSV-F más largo, es decir el dominio F1 se truncó después del residuo de aminoácido 513. Todas las construcciones comprendieron una marca HIS.

Las construcciones fueron evaluadas por los niveles de expresión, la estabilidad al almacenamiento y la unión al anticuerpo con el anticuerpo CR9501. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana, y de las CDR de las cadenas pesada y liviana de este anticuerpo se muestran más adelante. El CR9501 comprende las regiones de unión de los anticuerpos designados 58C5 en WO2012/006596.

25 Las construcciones fueron sintetizadas y sus codones optimizados en Gene Art (Life Technologies, Carlsbad, CA). Las construcciones se clonaron en el pCDNA2004 o fueron generadas mediante métodos estándar ampliamente conocidos en el campo que comprende mutagénesis dirigida al sitio y PCR y luego se secuenciaron. La plataforma de expresión utilizada eran las células 293Freestyle (Life Technologies). Las células fueron transfectadas transitoriamente usando 293Fectin (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se cultivaron durante 5 días a 37°C y 30 10% de CO₂. Se cosechó el sobrenadante del cultivo y se centrifugó por 5 min a 300 g para separar células y desechos celulares. A continuación, el sobrenadante centrifugado se filtró bajo condiciones estériles usando un filtro de vacío de 0.22 µm y se guardó a 4°C hasta el momento del uso.

35 Los sobrenadantes del día 5 fueron evaluados por la expresión de la proteína F por transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal CR9503, que comprende las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo de RSV F Motavizumab (conocido como CR9503). Se evaluaron los niveles de expresión aproximados de las construcciones de la proteína F de prefusión del RSV usando el CR9503, un anticuerpo secundario conjugado al anti-IR-colorante humano (Li-Cor, Lincoln, NE) o un anti-IgG humano conjugado a HRP de ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Después se estimaron las cantidades de proteína usando una serie de dilución de la proteína RSV estándar purificada, ya sea visualmente o usando el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey CLx. Como 40 alternativa, se usó Quantitative Octet (BioLayer Interferometry) para medir la concentración de la proteína en los sobrenadantes. Para evaluar la estabilidad de la construcción y para identificar los efectos estabilizantes positivos o negativos de los motivos de trimerización introducidos, las construcciones capaces de unirse al CR9501 fueron tratadas en un rango de temperaturas de 45-65 °C durante 30 minutos para evaluar la estabilidad del epítopo de CR9501. Este procedimiento se describe con detalle en el Ejemplo 8. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

45 Tabla 1. Expresión y estabilidad de las construcciones de RSV F con diferentes motivos de trimerización

Proteína del RSV	Descripción				Estabilidad*
	Motivo de trimerización	Modificaciones	Punto de terminación	Expresión (ug/ml)	
F18	Fibrina	Ninguna	513	2	inestable
F19	Fibrina	Ninguna	499	0	ND

F20	Cierre de isoleucina (L)	502 509 516 Ile	516	0	ND
F21	Cierre de isoleucina (L)	Ninguna	501	0	ND
F22	Cierre de isoleucina (L)	K483E + E488K	495	0	ND
F23	Cierre de isoleucina (S)	Ninguna	495	0.3 1	estable
F46	Cierre de isoleucina (S)	Ninguna	513	No se expresó	ND

*La estabilidad se define como se describe en el Ejemplo 7; ND: No determinado

1 Nivel de expresión determinado por transferencia Western como se describe en el Ejemplo 1.

Según se puede observar en la Tabla 1, las únicas construcciones que se expresaron fueron las variantes de Fibrina (F18) y F23. Aunque F18 era trimérica y mostraba expresión, era inestable cuando se almacenaba a 4 °C. Por el contrario, F23 era estable a 4 °C, se unía a los anticuerpos específicos de prefusión, pero aparentemente era monomérica. Por ello se usaron ambas variantes, F18 y F23, para optimizar tanto la estabilidad como la trimerización.

- 5 A continuación, se obtuvieron varias construcciones en las cuales el péptido de fusión por el extremo N-terminal de F1 se fijó por fusión al extremo C-terminal del dominio F2. Todas las construcciones comprendieron una marca His.

Se elaboraron varias construcciones, incluyendo construcciones en las cuales ambos sitios de clivaje de furina se habían mutado dando como resultado una proteína F soluble que aún contenía al péptido p27 (es decir, F12, F15.1 y F17). En otras construcciones, se reemplazó la región de 27 residuos (bucle P27) que es clivado del precursor F0 por un bucle alternativo cerrado o secuencia de unión: ya sea por reemplazo de la región de RSV-F por la región 'homóloga' de PIV-5 F, la proteína F de prefusión que se había producido y cristalizado exitosamente (F25) o por reemplazo de la región por un bucle mínimo (GS)_n que formaría un puente entre los extremos de F2 y F1 (F24) o por reemplazo de la región por la región conservada central de RSV-G (F26). La modelación de homología de RSV-F basado en PIV-5 y las mediciones in silico dieron como resultado la elección de un bucle mínimo de 5 residuos de aminoácidos entre los residuos 108 y 136. Como conectores, se eligieron los residuos Gly (G) y Ser (S) que son flexibles y polares y que tienen una mayor probabilidad de adaptarse (F24). Adicionalmente, se mutó F137 por S porque las modificaciones locales causadas por el bucle podrían desplazar la F hidrofóbica y causar inestabilidades. Esto se muestra a continuación. Además, se muta R106 por Q y se reemplazan 27 residuos (109-135) por GSGSG.

PAANN**RARREAPQYMN**Y**TINTTKNLNVSISKRRKR**_{R136}**FLGFL**LGVG

PAANN**QAR** **GSGSG**_{R136}**SLGFL**LGVG

- 20 Según se muestra en la Tabla 2, todas las variantes no mostraron expresión, o una expresión muy baja, excepto por la variante con el bucle corto GSGSG (F24) que mostró una expresión mucho mayor (44 µg/ml) en comparación con la construcción F del RSV de tipo salvaje, es decir una construcción similar, sin dicho conector (F11). Sin embargo, F24 que era trimérica, era inestable al almacenamiento al igual que todas las demás variantes con un motivo de trimerización de Fibrina C-terminal. Todas las variantes contenían una marca HIS.

- 25 Tabla 2. Expresión y estabilidad de las construcciones de RSV F con diferentes conectores de F1-F2

Proteína del RSV	Variant e	Descripción					Estabilidad*
		Motivo de trimerización	Conector F1, F2	Modificaciones	Punto de terminación	Expr. (ug/ml)	
F11	B1	No contiene	No contiene	Ninguna	513	2.5	estable
F18	B1	Fibrina	No contiene	Ninguna	513	2	inestable
F12	B1	Fibrina	p27	KO del sitio de furina	513	0.1	inestable

ES 2 715 378 T3

F15.1	B1	No contiene	p27	KO del sitio de furina	525	0.5	ND
F17	A2	Fibritina	p27	KO del sitio de furina	513	0	ND
F24	B1	Fibritina	Q_GSGSG_S	Ninguna	513	44	inestable
F25	B1	Fibritina	PIV	Ninguna	513	0	ND
F26	B1	Fibritina	G CR	Ninguna	513	0	ND

*La estabilidad se define como se describe en el Ejemplo 7. El nivel de expresión se determina como se describe en el Ejemplo 1.

A continuación, se combinaron las modificaciones más favorables para hallar los polipéptidos F de prefusión óptimos. Se efectuaron combinaciones de variantes con el bucle GSGSG, el truncamiento C-terminal de F1 y la adición de ya sea el motivo de Fibritina (SEQ ID N°: 4) o el motivo de cierre de isoleucina (S) (SEQ ID N°: 3) (véase la Tabla 3).

5

Tabla 3. Expresión y estabilidad de las construcciones de RSV F con las combinaciones de optimizaciones de acuerdo con las Tablas 1 y 2.

Proteína del RSV	Variante	Punto de terminación	Descripción			Estabilidad del epitope de CR9501)	
			Motivo de trimerización	Conector F1, F2	($\mu\text{g/ml}$)	Calor (oC)	Almacenamiento
F11	B1	513	No contiene	No contiene	2.5	48	Estable
F23	B1	495	Cierre de isoleucina (S)	No contiene	0.3	ND	Estable
F24	B1	513	Fibritina	Q_GSGSG_S	44	51	Inestable
F45	B1	495	Fibritina	No contiene	0	ND	ND
F44	B1	495	Fibritina	Q_GSGSG_S	0	ND	ND
F49	B1	495	No contiene	No contiene	2	ND	Estable
F50	A2	495	No contiene	No contiene	2	ND	Estable
F43	B1	495	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	0.4	53	Estable
F47	A2	495	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	5	52	Estable
F56	B1	513	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	0.4	ND	Estable
F46	B1	513	Cierre de isoleucina (S)	No contiene	0	ND	inestable
F42	B1	513	No contiene	Q_GSGSG_S	20	54	Estable
F57	A2	513	No contiene	Q_GSGSG_S	2-10	54	Estable

ND significa no determinado

*La estabilidad al almacenamiento determinada como en el Ejemplo 7. *La estabilidad al calor determinada como en el Ejemplo 8. El nivel de expresión se determinó por transferencia Western (descrito en el Ejemplo 1).

10

La adición del bucle GSGSG siempre aumentó la expresión de las construcciones funcionales así como la estabilidad al calor de la proteína. La combinación del bucle GSGSG con la F truncada y el motivo de cierre de isoleucina (S) (F43, F47) mostró una buena expresión, estabilidad al calor y una buena estabilidad al almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, estas variantes aún eran monoméricas. El motivo de trimerización de cierre de isoleucina (S) mostró una mayor expresión con la variante F que era F truncada en el extremo C-terminal en la posición 495 (compárese F43 con F56 y F23 con F46). Por el contrario, en el caso de las variantes con el dominio de trimerización de Fibritina, un truncamiento en la posición 513 mostró una expresión elevada en comparación con el truncamiento en la posición 495 que no mostró expresión (compárese F24 con F44).

15

Dado que la marca HIS podría interferir con el plegamiento nativo de los trímeros, se obtuvieron variantes sin la marca HIS para la variante de Fibrina y de cierre de isoleucina (S) (Table 4).

Tabla 4. Expresión y estabilidad de las construcciones RSV F con y sin una marca HIS

Proteína del RSV	Variante	Motivo de trimerización	Conector F1, F2	Punto de terminación	Expresión ug/ml	% de trimerización	Calor (oC)	Almacenamiento	Marcas
F24	B1	Fibrina	Q_GSGSG_S	513	44	Trimérico (SEC)	51	inestable	Marca HIS
F24-	B1	Fibrina	Q_GSGSG_S	513	55	100% (Nativa)	ND	inestable	No contiene
F47	A2	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	495	5	0% (Odyssey)	52	estable	Marca HIS
F47-	A2	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	495	10	2-5% (Odyssey)	53	estable	No contiene
A2_F24	A2	Fibrina	Q_GSGSG_S	513	5.3	Trimérica (Nativa)	48.75	inestable	No contiene

5 *La estabilidad al almacenamiento determinada como se describe en el Ejemplo 7; la estabilidad al calor determinada como se describe en el Ejemplo 8; ND: no determinado.

Notablemente, la supresión de la marca HIS aumentó la expresión en F47. Aún más, en F47 aumentó ligeramente el contenido trimérico y en F24 solamente aumentó moderadamente el nivel de expresión.

10 A continuación, se evaluaron varios dominios de trimerización y truncamientos alternativos en combinación con la variante F con el bucle GSGSG estabilizada (F47) (véase la Tabla 5). Todas las variantes tienen un bucle GSGSG y contienen una marca HIS.

Tabla 5. Expresión y estabilidad de variantes RSV F con dominios de trimerización alternativos

Proteína del RSV	Variante	Descripción				% de trimerización	Unión al anticuerpo	
		Motivo de trimerización	Modificaciones	Punto de terminación	Expresión (µg/ml)		CR9501	CR9503
F47	A2	Cierre de isoleucina (S)	No contiene	495	5	0%	+	+
P1	B1	Cierre de isoleucina (S)	S502T	502	3.5	0%	+	+
Mat1	A2	Matrillina larga	No contiene	520	12	trímeros y hexámeros	-	+
Mat2	A2	Matrillina corta	No contiene	516	0	ND	-	-
Mat3	A2	Matrillina corta	No contiene	495	1.5	ND	-	-
opt GCN	A2	GCN4II optimizado	No contiene	516	0	ND	-	-
opt GCN+L 512K	A2	GCN4II optimizado	L512K	516	1	ND	+	-

La unión al anticuerpo se define como la unión el día de la cosecha (como se describe en el Ejemplo 7;

+ indica que hay unión; - indica que no hay unión.

El nivel de expresión se determina como se describe en el Ejemplo 1.ND: no determinado

5 Se encontró que solamente el dominio matrillina 1 (Dames-SA et. al., Nat. Struc. Biol., 5(8), 1998) que contiene al dominio de cierre N-terminal y la parte C-terminal con los residuos de cisteína que potencialmente pueden formar puentes disulfuro intertriméricos, permite niveles de expresión mayores que F47 (Tabla 5, Matrillina larga). Aún más, la variante con el motivo de trimerización de Matrillina larga presenta proteínas F triméricas. Sin embargo, el product no se unió al Mab CR9501 específico de prefusión y también mostró especies hexaméricas lo cual hace que el dominio de trimerización de Matrillina 1 no sea adecuado para la producción de la proteína F trimérica nativa. Ninguno de los
10 motivos de cierre basados en matrillina o basados en GCN4II mostró una mayor expresión o estabilidad con relación a F47 (Tabla 5, Matrillina corta, GCN4II optimizado). Nuevamente, el truncamiento en 495 da como resultado niveles de expresión más altos. La adición de un motivo GCN4 que contenía una secuencia de disparo optimizada no mostró expresión.

15 El GCN4 II es un dominio de trimerización que se usa con éxito para estabilizar el trómero de prefusión del tipo 5 de parainfluenza (Yin et al., Nature 439: 38-44, 2006) y también fue evaluado por otros para estabilizar la F de prefusión del RSV (como se divulga, por ejemplo, en WO2010/149743, WO2010/14975, WO2009/079796, WO2010/158613). El dominio de trimerización GCN4II se evaluó y comparó con las construcciones que contienen al dominio de cierre de isoleucina (S) (SEQ ID N°: 3) o al dominio de Fibrina (SEQ ID N°: 4) (los resultados se muestran en la Tabla 6). Estas variantes también se compararon con otras modificaciones, es decir un conector corto basado en una sola Lisina y la mutación L512K. Todas las variantes contenían una marca HIS.
20

Tabla 6. Expresión y estabilidad de las variantes RSV F con reemplazo de GCN4II, L512K y p27 replacement (un solo conector de aminoácido (K) entre F1 y F2)

Proteína del RSV	Variante	Descripción					Estabilidad	
		Motivo de trimerización	Conector F1, F2	Modificaciones	Punto de terminación	Expr. (µg/ml)	Calor (oC)	Almacenamiento*
F18	B1	Fibrina	No contiene	No contiene	513	2	ND	inestable
F24	B1	Fibrina	Q_GSGSG_S	No contiene	513	44	51	inestable
F43	B1	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	No contiene	495	0.4	53	estable
P1	B1	Cierre de isoleucina (S)	Q_GSGSG_S	S502T	502	3.5	54	ND
F42	B1	No contiene	Q_GSGSG_S	No contiene	513	16.1	54	estable
P2	B1	No contiene	K	No contiene	513	14.3	54	estable
P3	B1	GCN4II	No contiene	L512K	516	0	ND	ND
P4	B1	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P5	B1	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P6	A2	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P7	A2	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND

25 La estabilidad al almacenamiento determinada como se describe en el Ejemplo 7; los niveles de expresión determinados como se describe en el Ejemplo 1; la estabilidad al calor determinada como se describe en el Ejemplo 8; ND: no determinado.

El ligamiento corto entre F1 y F2 parece ser comparable al bucle GSGSG. La adición del motivo GCN4II no dio como resultado expresión de la proteína F en ninguna de las construcciones evaluadas (es decir, la secuencia RSV A2 F descrita en WO2010/149743 o en WO2010/149745, la secuencia RSV A2 F usada de acuerdo con la invención o la secuencial RSV B1 F).

5 Se demostró de acuerdo con la invención que la introducción de estos dos tipos de modificaciones, es decir la introducción de una secuencia de unión y el dominio de trimerización heterólogo, no era suficiente para permitir la expresión de una proteína F de prefusión trimérica estable. Además de las dos regiones principales de inestabilidad que fueron estabilizadas, es decir, HRB y el péptido de fusión, como se describió previamente, hay otras regiones en la proteína F de prefusión que también contribuyen y/o acomodan el repliegamiento dramático a la F de postfusión, y se pueden optimizar más posiciones en la secuencia para detener el repliegamiento de la proteína F de prefusión. Por ello, se mutaron diferentes residuos de aminoácidos en el dominio HRA y HRB y en todos los dominios que toman contacto con estas regiones en la F de prefusión para aumentar la estabilidad de la estructura de prefusión, como se describe en los siguientes Ejemplos.

10 EJEMPLO 2

Preparación de polipéptidos F de prefusión del RSV estables: mutaciones estabilizantes

Dado que el contenido trimérico (para la construcción F47) y la estabilidad al almacenamiento (para la construcción F24) no eran óptimos, se obtuvieron variantes adicionales que contenían mutaciones puntuales para aumentar los niveles de expresión, la estabilidad y la estructura trimérica nativa. Los resultados se detallan en las Tablas 7 y 8.

15 Tabla 7. Expresión y estabilidad de variantes F47-

Proteína del RSV	Expresión (ug/ml)	% de trimerización	Calor (oC)
F47-	10	2-5%	53
F47- + K465E	6	2.4%	ND
F47- + D479K	5	29%	50.77
F47- + K176M	13	5%	ND
F47- + K209Q	9	3%	52.9
F47- + S46G	38	11%	59.38
F47- + S215P	8	1-2%	57.21
F47- + N67I	15	2%	59.84
F47- + K465Q	18	2%	54.3
F47- S46G+N67I	31	6%	>60
F47- S46G+S215P	38	6%	>60
F47- K465Q+K209Q	12	1%	53.3
F47- K465Q+S46G	28	7%	57.7
F47- K465Q+N67I	17	2%	59
F47- K209Q+N67I	15	4%	>60
F47- K209Q+S215P	15	2%	56.7

ND: no determinado; el nivel de expresión determinado como se describe en el Ejemplo 1. La estabilidad al calor determinada como se describe en el Ejemplo 8.

Nomenclatura de las mutaciones basado en la secuencia de tipo salvaje (wt) (SEQ ID N°: 1).

20 Todas las construcciones son variantes de F47- : tipo A2, motivo de cierre de isoleucina (S) (SEQ ID N°: 3), conector GSGSG; punto de terminación 495, sin marca HIS (SEQ ID N°: 16). Según se muestra en la Tabla 7, muchas mutaciones aumentaron la expresión de F47-, pero sólo la variante F47_S46G también mostró un nivel más alto de trímeros además de la expresión alta.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la expresión y la estabilidad de las variantes F24. Todas las variantes eran del tipo A2 de RSV, con un motivo de Fibrina, un conector de GSGSG; punto de terminación 513, sin marca HIS.

25 Tabla 8. Expresión y estabilidad de variantes A2_F24- (SEQ ID N°: 19)

ES 2 715 378 T3

Proteína del RSV	Expresión (µg/ml)	Almacenamiento	
		Punto final	Fase de asociación
A2_F24	5.3	69	ND
A2_F24 K508E	5.3	64	ND
A2_F24 K498E	1.7	ND	ND
A2_F24 E487I	25.0	10	ND
A2_F24 E487K	7.1	ND	ND
A2_F24 E487N	42.4	22	ND
A2_F24 E487P	12.8	46	ND
A2_F24 E487Q*	14.8	50	ND
A2_F24 E487R	8.7	59	ND
A2_F24 E487S	6.7	46	ND
A2_F24 E487Y	10.5	36	ND
A2_F24 D486N	31.2	19	ND
A2_F24 D479N	5.2	ND	ND
A2_F24 D479K	1.5	62	ND
A2_F24 E472Q	1.9	ND	ND
A2_F24 E472K	0.9	ND	ND
A2_F24 K465E	14.8	76	ND
A2_F24 K465Q*	13.6	92	No es estable
A2_F24 E463K	3.1	ND	ND
A2_F24 E463Q	6.0	ND	ND
A2_F24 G430S	4.8	ND	ND
A2_F24 N428R	5.2	35	ND
A2_F24 N426S	18.6	71	ND
A2_F24 K421N	9.2	75	ND
A2_F24 E328K	9.5	21	ND
A2_F24 T311S	3.5	70	ND
A2_F24 I309V	11.3	69	ND
A2_F24 D269V	0.0	ND	ND
A2_F24 S215P*	18.7	99	Estable
A2_F24 K209Q	31.4	63	ND
A2_F24 V207P	3.3	79	ND
A2_F24 I206P	5.4	55	ND
A2_F24 L204P	5.9	ND	ND

ES 2 715 378 T3

A2_F24 L203P	0.8	ND	ND
A2_F24 Q202P	4.4	ND	ND
A2_F24 K201Q	21.3	62	ND
A2_F24 D194P	1.9	ND	ND
A2_F24 L193P	6.5	42	ND
A2_F24 V192P	0.6	32	ND
A2_F24 V185N	50.2	38	ND
A2_F24 GV184EG	3.5	ND	ND
A2_F24 G184N	59.8	37	ND
A2_F24 V178P	14.8	23	ND
A2_F24 A177P	2.0	ND	ND
A2_F24 K176M	14.7	58	ND
A2_F24 K176E	0.7	ND	ND
A2_F24 N175P	34.3	55	ND
A2_F24 S169P	0.5	ND	ND
A2_F24 K168P	0.1	ND	ND
A2_F24 K166P	12.3	45	ND
A2_F24 V157P	0.2	ND	ND
A2_F24 E92D	47.4	94	No es estable
A2_F24 K85E	1.1	ND	ND
A2_F24 K80E	51.9	60	ND
A2_F24 K77E	22.4	ND	ND
A2_F24 N67I*	89.8	101	Estable
A2_F24 I57V		ND	ND
A2_F24 VI56IV	16.5	54	ND
A2_F24 S46G*	40.7	96	No es estable

Las construcciones marcadas con un * fueron evaluadas por su trimerización y se encontró que todas eran triméricas

El nivel de expresión se determina como se describe en el Ejemplo 1. La estabilidad del punto final se muestra aquí como el porcentaje de unión al anticuerpo (CR9501) de la prefusión después de 5 días de almacenamiento a 4°C con relación al día 1; la estabilidad de la fase de asociación se determina como se describe en el Ejemplo 9.

- 5 Muchas mutaciones aumentaron la expresión de A2_F24-. Para muchas mutaciones había una correlación aparente entre la expresión mejorada en el antecedente F47- (Tabla 7) y en el antecedente A2_F24- (Tabla 8). N67I tuvo el impacto más positivo sobre la expresión de F en el antecedente A2_F24-. El aumento más significativo de la expresión se obtuvo con las mutaciones puntuales individuales: S46G, S215P, N67I, K80E, E92D, D486N, G184N, V185N, E487N, N175P, K209Q, E487I, E487Q, K77E, K201Q, N426S y K465Q. En la selección inicial usando el ensayo de estabilidad de punto final (Ejemplo 7), las variantes con la mayor expresión mostraron también la mejor estabilidad al almacenamiento (E92D, K465Q, K465E, N426S, S46G, S215P y N67I). Para evaluar si estas mutaciones aún estabilizaban la conformación de la prefusión, se diluyeron los sobrenadantes de cultivo a 5 y 10 µg/ml basado en los resultados cuantitativos del Western results y se guardaron por hasta 33 días a 4 °C. Como mutantes puntuales individuales, solamente N67I y S215P eran completamente estables en el tiempo (véase el Ejemplo 9).
- 10

Posteriormente, se combinaron varias mutaciones que mostraron una expresión elevada y una buena estabilidad de la conformación de prefusión para evaluar si las estabilizaciones eran aditivas o si tenían un posible efecto sinérgico (Tabla 9).

Tabla 9. Expresión y estabilidad de variantes de A2_F24 con dos mutaciones adicionales.

Proteína del RSV	Expresión (µg/ml)	Estabilidad*
A2_F24 K465Q + S46G	21.8	No es estable
A2_F24 K465Q + N67I	122.3	Estable
A2_F24 K465Q + E92D	10.5	Estable
A2_F24 K465Q + S215P	59.8	Estable
A2_F24 S46G + N67I	115.5	Estable
A2_F24 S46G + E92D	14.3	No es estable
A2_F24 N67I + E92D	134.2	Estable
A2_F24 N67I + S215P	152.1	Estable
A2_F24 E92D + S215P	49.1	Estable
A2_F24 K465Q+S215P	53.3	Estable
A2_F24 S46G+S215P	43.8	Estable

5 La estabilidad al almacenamiento se refiere al análisis de la fase de asociación ilustrado en el Ejemplo 9.

El nivel de expresión se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

Todas las variantes son variantes de F24 tipo A2, con un motivo de Fibrina, un conector GSGSG; el punto de terminación 513, unión a todos los Mab, sin marca HIS (SEQ ID N°: 19).

10 Cuando se combinaron las mutaciones puntuales identificadas previamente se pudieron observar efectos sinérgicos muy interesantes, en especial en términos de los niveles de expresión, donde las combinaciones relacionadas con N67I son las más potentes. Todas produjeron mutantes dobles donde se habían incluido cualquiera de N67I y S215P que eran estables después de más de 30 días de almacenamiento a 4 °C (Ejemplo 9). Notablemente, se encontró que la mutación N67I tiene el efecto más fuerte sobre los niveles de expresión de la F de prefusión cuando se incluía en los mutantes dobles. A continuación, las combinaciones con las mutaciones S215P dieron como resultado una expresión
15 razonable. Se seleccionó la combinación de N67I con S215P dado que condujo a un nivel de expresión muy alto, y porque ambas mutaciones puntuales eran estables con el almacenamiento. Adicionalmente se observó que ambas N67I y S215P tenían la capacidad para estabilizar algunos de los mutantes que en la forma de mutaciones individuales eran inestables, lo cual indica que la región donde se encuentran estas dos mutaciones es central para los cambios de conformación que sufre la proteína durante la transición a la conformación de postfusión.

20 De acuerdo con la invención, se ha mostrado entonces que por lo menos algunas mutaciones dieron como resultado niveles de expresión aumentados y una mayor estabilización de la proteína de prefusión del RSV. Se espera que estos fenómenos se encuentren ligados. Todas las mutaciones que se describen en este ejemplo dieron como resultado una mayor producción de los polipéptidos F de prefusión. Solamente una selección de estos polipéptidos permaneció estable luego de un almacenamiento prolongado (véase el Ejemplo 9). El ensayo de estabilidad que se usó se basa en
25 la pérdida del epítipo CR9501 específico de prefusión en la parte superior de la proteína F de prefusión en un ensayo de unión y probablemente no sea suficientemente sensible como para medir todas las contribuciones a la estabilidad de la proteína completa. Las mutaciones con las cuales solamente se observa una mayor expresión comprenden entonces mutaciones potenciales (muy probablemente estabilizantes) que se pueden combinar con otras mutaciones estabilizantes para obtener una construcción F de prefusión con una gran estabilidad y niveles de expresión elevados.

30 A continuación, se verificó si la mutación doble N67I-S215P, al igual que las mutaciones individuales, podía estabilizar aquellas mutaciones puntuales que como mutantes individuales eran consideradas inestables basado en los criterios usados. Se seleccionaron mutaciones adicionales basado en los niveles de expresión y la estabilidad favorables de acuerdo con la Tabla 8. Se construyeron mutante triples de las variantes de RSV-F y se evaluaron sus niveles de expresión y su estabilidad (Tabla 10).

Tabla 10. Expresión y estabilidad de variantes de F24_N67I +S215P con una mutación adicional.

Proteína del RSV	Expresión (µg/ml)	Estabilidad*
A2_F24 N67I + S215P+K507E	344.6	++
A2_F24 N67I + S215P+E487I	239.4	+++
A2_F24 N67I + S215P+E487N	285.2	+++
A2_F24 N67I + S215P+E487Q	360.7	+++
A2_F24 N67I + S215P+E487R	130.9	+++
A2_F24 N67I + S215P+D486N	292.6	+++
A2_F24 N67I + S215P+D479N	97.1	+++
A2_F24 N67I + S215P+K465Q	283.3	+++
A2_F24 N67I + S215P+N426S	316.3	+++
A2_F24 N67I + S215P+K421N	288.4	+++
A2_F24 N67I + S215P+K209Q	245.0	+++
A2_F24 N67I + S215P+K201Q	231.9	+++
A2_F24 N67I + S215P+V185N	445.1	+++
A2_F24 N67I + S215P+G184N	326.7	+++
A2_F24 N67I + S215P+E92D	308.8	+
A2_F24 N67I + S215P+K80E	210.6	+
A2_F24 N67I + S215P+S46G	199.4	+++

Todas las variantes son variantes de A2_F24_N67I +S215P tipo A2, con motivo de Fibrina, conector GSGSG; punto de terminación 513, unión a todos los Mab, sin marca HIS (SEQ ID N°: 21).

*la estabilidad se refiere al análisis de la fase de asociación ilustrada en el Ejemplo 9.

- 5 + significa <10% de pérdida de unión a CR9501 después de 5 días; ++ significa <5% de pérdida de unión a CR9501 después de 5 días; +++ significa 0% de pérdida de unión a CR9501 después de 5 días.

- 10 Nuevamente, se observó un efecto aditivo sobre los niveles de expresión. Según lo esperado, los mutantes triples D479N y E487R se expresan a niveles algo menores porque los mutantes individuales también se encontraban entre los más bajos de las mutaciones seleccionadas (Tabla 8). Debido al efecto estabilizante de la mutación N67I+S215P, las mutaciones adicionales que son inestables como mutantes individuales, dio como resultado variantes F de perfusión estables cuando se agregaban al antecedente A2_F24 N67I+S215P. Algunos ejemplos muy ilustrativos son los mutantes triples con la V185N, G184N o E487N adicional que mostraban una expresión elevada pero una baja estabilidad como mutantes individuales (Tabla 8), pero mostraban una expresión aún mayor y eran muy estables cuando se agregan al antecedente A2_F24 N67I+S215P.

- 15 Las mutaciones estabilizantes también estabilizan a la proteína RSV-F de otras cepas y también en la variante F procesada.

- 20 Se aplicaron varias mutaciones que mostraron una gran expresión y una buena estabilidad de la conformación de perfusión a las proteínas RSV F de otras cepas (SEQ ID N°: 69 y 70) y se aplicaron a una variante de F RSV A2 sin mutaciones para el sitio de clivaje de furina (F18: SEQ ID N°: 71) para evaluar si las modificaciones constituyen una solución universal para estabilizar la F de perfusión del RSV.(Tabla 11)

Tabla 11. Expresión y estabilidad de variantes de A2_F18 con mutaciones adicionales y F de la cepa B1 (SEQ ID N°: 2) y tipo A CL57-v224 (SEQ ID N°: 69).

ES 2 715 378 T3

Proteína del RSV	Seq ID	Expresión relativa* (CR9503)	Estabilidad** después del día 5, %
A2_F18	71	0.018	0.0
A2_F18 N67I		0.449	73.2
A2_F18 S215P		0.129	9.1
A2_F18 E487Q		0.006	ND
A2_F18 N67I, S215P	72	0.484	103.4
A2_F18 N67I, E487Q		0.340	92.1
A2_F18 N67I, S215P, E487Q	76	0.355	92.7
A2_F18 N67I, S215P, E92D	78	0.318	96.0
A2_F18 N67I, S215P, D486N	79	0.522	101.3
A2_F18 N67I, S215P, K201N	77	0.643	102.7
A2_F18 N67I, S215P, K66E		0.800	103.0
A2_F18 N67I, S215P, S46G, K66E		0.820	103.5
A2_F18 N67I, S215P, E487Q, K66E		0.704	99.5
A2_F18 N67I, S215P, E92D, K66E		0.905	98.8
A2_F18 N67I, S215P, D486N, K66E		0.863	96.6
A2_F18 N67I, S215P, K201N, K66E		1.021	105.5
A2_F18 N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		0.594	95.0
B1_T67I, S215P	73	0.434	90.9
B1_T67I, bucle S215P	22	0.552	108.2
CL57v224_N67I, S215P	74	0.698	94.9
CL57v224_N67I, bucle S215P	75	0.615	98.4

La expresión de proteínas (concentración en el sobrenadante de células transfectadas de manera transitoria) se midió con el método de Quantitative Octet.

* La expresión relativa se normaliza para la expresión de A2_F24_N67I, S215P, E487Q (SEQ ID N°: 33)

5 ** Estabilidad: se expresa como un % la concentración de proteínas medida después del almacenamiento a 4C durante 5 días, con relación al día de cosecha. Las concentraciones se midieron con el método de Quantitative Octet usando el anticuerpo CR9501. NA: datos no disponibles: no se detectó unión a CR9501.

10 Cuando las mutaciones puntuales identificadas previamente se introducían en A2_F18 (SEQ ID N°: 71), la estabilidad y los niveles de expresión eran muy similares en comparación con la variante de cadena simple F24 (SEQ ID N°: 21) que contenía un bucle corto entre F1 y F2. Nuevamente, se observó sinergia mostrando una mayor expresión y estabilidad cuando las mutaciones se agregaban a variantes que contenían a la mutación N67I o a la mutación doble N67I, S215P. La mutación puntual doble N67I, S215P no solo estabiliza la F de prefusión de la cepa A2 sino que también a la prefusión de las cepas B1 y CL57-v224 (Tabla 11).

Las mutaciones estabilizantes también estabilizan a la proteína RSV-F de longitud completa.

15 Se aplicaron varias mutaciones, que mostraron una gran expresión y una buena estabilidad de la conformación de prefusión en la versión soluble de la RSV-F correspondiente al ectodominio, a la proteína RSV-F de longitud completa. Las mutaciones se introdujeron en la RSV-F de longitud completa con o sin mutaciones en el sitio de clivaje de furina. No se fusionó ningún dominio de trimerización a estas variantes (Tabla 12)

ES 2 715 378 T3

Tabla 12. Expresión y estabilidad de variantes de versiones de longitud completa de A2_F18 y A2_F24 con mutaciones adicionales.

Sustituciones de aminoácidos	Variante de la proteína F del RSV*		Atributos	
	SEQ ID N°	Conector F1, F2	Expresión, incremento**	Estabilidad al calor***
Ninguna (tipo salvaje A2 de F, longitud completa)	1	ninguno	1	-
N67I		ninguno	1.4	N.D.
S215P		ninguno	1.4	N.D.
E92D		ninguno	1.4	N.D.
N67I, K465Q		ninguno	1.4	N.D.
N67I, S46G		ninguno	0.2	N.D.
N67I, E92D		ninguno	1.4	N.D.
N67I, K80E		ninguno	2.3	N.D.
N67I, G184N		ninguno	1.5	N.D.
N67I, V185N		ninguno	1.4	N.D.
N67I, E487Q		ninguno	2.5	N.D.
N67I, S215P, V185N		ninguno	2.7	N.D.
N67I, S215P, K508E		ninguno	3.0	N.D.
N67I, S215P, K80E		ninguno	3.1	N.D.
N67I, S215P, K465Q		ninguno	2.9	N.D.
N67I, S215P	80	ninguno	2.4	++
N67I, S215P, G184N		ninguno	7.6	++
N67I, S215P, E92D	82	ninguno	6.8	N.D.
N67I, S215P, S46G	88	ninguno	6.8	+
N67I, S215P, D486N	86	ninguno	5.9	+++
N67I, S215P, E487Q	84	ninguno	6.2	N.D.
N67I, S215P, S46G, K66E		ninguno	12.1	+++
N67I, S215P, D486N, K66E		ninguno	9.2	+++
N67I, S215P, S46G, E92D, K66E		ninguno	11.8	+++
N67I, S215P, S46G, E487Q, K66E		ninguno	11.0	+++
N67I, S215P, S46G, D486N, K66E		ninguno	10.5	+++
N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		ninguno	7.2	+++
N67I, S215P, S46G, K66E, I76V		ninguno	9.7	+++
N67I, S215P, S46G, K80E		ninguno	4.5	N.D.

ES 2 715 378 T3

N67I+S215P+G184N+K80E+E92D+E487Q+S46G		ninguno	9.1	N.D.
No contiene		Q_GSGSG_S	3.8	-
N67I, S215P	81	Q_GSGSG_S	6.2	N.D.
N67I, S215P, G184N		Q_GSGSG_S	7.2	++
N67I, S215P, E92D	83	Q_GSGSG_S	5.9	N.D.
N67I, S215P, S46G	89	Q_GSGSG_S	5.3	++
N67I, S215P, D486N	87	Q_GSGSG_S	5.2	+++
N67I, S215P, E487Q	85	Q_GSGSG_S	4.6	N.D.
N67I, S215P, S46G, K66E		Q_GSGSG_S	11.7	+++
N67I, S215P, D486N, K66E		Q_GSGSG_S	13.8	+++
N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		Q_GSGSG_S	6.8	+++
N67I+S215P+G184N+K80E+E92D+E487Q+S46G		Q_GSGSG_S	3.6	N.D.

Nivel de expresión determinado usando FACS. N.D.: no determinado. *todas las variantes se basan en la secuencia de la proteína F A2 del RSV. ** comparación con la proteína de tipo salvaje, incremento de MFI sobre 9503.

La estabilidad se evaluó por tratamiento con calor de las células HEK293T durante 5-10 minutos a 46, 55.3, 60oC.

*** leyenda para la lectura de estabilidad

- 5 - disminución de la unión a prefusión – unión específica al Mab CR9501 después de 46oC (por ejemplo, del tipo salvaje)
+ disminución ligera de la unión a CR9501 después de 46oC pero no hasta el mismo grado fuerte que el tipo salvaje
++ sin cambios en la unión a CR9501 hasta 60oC, a 60oC alguna disminución en la unión a CR9501
+++ sin cambios en la unión a CR9501 a 60oC

10 Las mutaciones puntuales estabilizantes identificadas previamente también eran estabilizantes en la proteína F de longitud completa. El aumento en el nivel de expresión era menos pronunciado pero mostró la misma tendencia. Esto puede deberse a los diferentes antecedentes en las cuales se introdujeron las mutaciones pero también al método de cuantificación diferente (FACS versus transferencia Western) y un máximo biológico de expresión debido al reciclaje de las proteínas de superficie. La introducción de la secuencia conectora (o bucle corto) aumentó la expresión y la estabilidad y lo mismo hicieron las mutaciones puntuales. Las mutaciones puntuales casi no eran sinérgicas o no eran sinérgicas con el bucle corto (similar a lo que se encontró para la proteína soluble (Tablas 9-11)

15 Debido a que la mutación puntual en la posición 67 tenía tal efecto positivo sobre el nivel de expresión y la estabilidad, se evaluaron todas las sustituciones de aminoácidos para esta posición con el fin de estudiar si se había elegido a las más óptimas o si es posible mejorara estas posiciones. (Tabla 13)

Tabla 13. Análisis de sustitución completa de la expresión y la estabilidad para la posición 67 en el antecedente A2_F24.

Sustitución de aminoácido	Expresión relativa*	Estabilidad** después del día 4, %	Estabilidad** después del día 10, %
N67A	1.696	0.0	0.0
N67C	1.759	16.7	0.0
N67D	1.702	0.0	0.0
N67E	1.357	0.0	0.0
N67F	2.565	102.2	108.1

N67G	0.853	ND	ND
N67H	1.509	0.0	0.0
N67I	3.773	98.2	102.7
N67K	0.487	ND	ND
N67L	3.609	107.5	96.4
N67M	2.579	87.3	78.7
N67P	2.414	14.3	0.0
N67Q	0.955	ND	ND
N67R	0.523	ND	ND
N67S	1.277	0.0	0.0
N67T	1.577	0.0	0.0
N67V	2.457	84.2	77.0
N67W	1.794	99.9	104.3
N67Y	1.830	61.3	45.8

* Expresión relativa: la concentración de proteínas se midió con el método Quantitative Octet usando el anticuerpo CR9503 y se expresó con relación a la concentración de A2_F24 (SEQ ID N°: 19)

** Estabilidad: se expresa como un % la concentración de proteínas medida después del almacenamiento a 4C durante 5 y 10 días, con relación al día de cosecha. Las concentraciones se midieron con el método de Quantitative Octet usando el anticuerpo CR9501. ND: datos no disponibles: no se detectó unión a CR9501.

5

Según se muestra en la Tabla 13, primariamente los residuos hidrofóbicos y en particular Ile, Leu y Met en la posición 67 pudieron aumentar la expresión y la estabilidad. La Ile es el residuo que más aumento la expresión y la estabilidad. Los residuos Glu y Gln, el residuo más pequeño Gly y los residuos de carga positiva Arg y Lys tuvieron el efecto más desestabilizante en la posición 67 sobre la conformación de la prefusión.

10

De acuerdo con la invención, las mutaciones de aminoácidos que estabilizan la conformación de la prefusión de la proteína F del RSV se pueden agrupar en diferentes categorías que estabilizan la conformación de diferentes maneras. Las estrategias para la estabilización de la F de prefusión se basan en el modelo de homología del RSV-F que se basó en la estructura cristalina de PIV5 (Yin et. al., 2006) y la alineación en la página 27.

Residuos de aminoácidos 67 y 215:

15

Los residuos de aminoácidos en las posiciones 67 y 215 están muy cerca en la estructura 3D del modelo de la prefusión y la estructura cristalina de postfusión. Los residuos están cerca del puente disulfuro conservado en la parte superior de la región DIII que forma la articulación a lo largo de la cual se repliega la región HRA en el trímero helicoidal extendido en el largo bucle superenrollado elongado. Las mutaciones en esta región afectarán a la función de articulación y por ello es que las mutaciones introducidas estabilizan la conformación de la prefusión por obstrucción de dicha función de articulación.

20

Residuos de aminoácidos 77, 80

Los residuos de aminoácidos en las posiciones 77 y 80 se encuentran dentro de la hélice larga (residuos 76-98) por el extremo C-terminal de F2 que está en contacto estrecho con el conjunto de estructuras secundarias en DIII por el extremo N-terminal de F1 que se repliega en la estructura de bucle superenrollado largo de la conformación de postfusión. Dado que se deben separar estas dos regiones durante el repliegamiento de pre- a postfusión, los aminoácidos en esta región que impiden esta separación estabilizarían la conformación de la prefusión. Debido a que estas dos regiones deberían apartarse durante el repliegamiento, se pueden optimizar algunos de los residuos para reforzar la interacción. Un ejemplo de una repulsión que se observó se encontraba entre Lys80 de carga positiva. La mutación de Lys80 por el residuo Glu de carga negativa aumentó la expresión de la prefusión de F. Debido a la transición sucesiva hacia la conformación de postfusión estas mutaciones se pueden combinar con otras mutaciones estabilizantes, como N67I y S215P, para obtener el beneficio completo de esta estabilización, según se muestra en la Tabla 10.

25

30

Residuo de aminoácido 92

El residuo de aminoácido en la posición 92 también se encuentra dentro de la hélice larga (residuos 76-98) por el extremo C-terminal de F2 que está en contacto estrecho con el conjunto de estructuras secundarias en DIII por el extremo N-terminal de F1 que se repliega en la estructura de bucle superenrollado largo de la conformación de postfusión. Cuando esta hélice se separa de la region HRA, es tirado hacia la región DIII que contiene al epitope Synagis (epitope II) (Arbiza et al., J. Gen. Virol. 73: 2225–2234, 1992) y el residuo Glu92 de carga negativa se mueve hasta que se encuentra muy cerca del residuo Arg282 de carga positiva en la conformación de postfusión. La mutaciones que reducen este tirón estabilizarán la conformación de la prefusión. La mutación de Glu92 por un residuo Asp conservado reducirá el tirón porque no puede alcanzar al residuo Arg282.

Residuos de aminoácidos 486, 487

Los residuos de aminoácidos 486, 487 y 489 en la parte superior de HRB en la conformación de la prefusión forma un parche de carga negativa. La mutación Glu487 por Asn o Ile aumentó la expresión de la prefusión de F. Las mutaciones de Asp486 por Asn o Gln y/o de Glu489 en Asn, Ile o Gln tendrán el mismo efecto. Debido a la transición sucesiva hacia la postfusión estas mutaciones se pueden combinar con otras mutaciones estabilizantes, como N67I y S215P, para obtener el beneficio completo de esta estabilización, según se muestra en la Tabla 10, por ejemplo D486N.

Residuos de aminoácidos 175, 184, 185

Para el replegamiento de la conformación de prefusión a la de postfusión, la región entre los residuos 175 y 193 tiene que transformarse de una horquilla en bucle – beta a una hélice.

Esta región demuestra la transición estructural más dramática. Parte de esta región tiene en realidad la mayor predicción de alfa-hélice. Las estructuras helicoidales reales en el modelo de prefusión se muestran a continuación resaltadas con gris. Esta región completa es transformada en una gran hélice cuando se repliega en la conformación de postfusión. En la secuencia inferior, los residuos están resaltados con gris, donde la mayor predicción de hélice se basa en Agadir (<http://agadir.crg.es/>). Resulta claro a partir de esta comparación que la parte C-terminal que se mantiene en una horquilla beta en la conformación de la prefusión (residuos 187-202), presenta la mayor tendencia a formar una hélice alfa.

150	160	170	180	190	200	210
<p>SGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLS TNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK NYIDKQLLP IVNKQSC</p>						
hhhhh	hhhhhh	hhhhh	ssssss	sssssss	hhhhhhh	

SGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLS **TNKAVVSLSNGVSVLTSKVL**DLK NYIDKQLLP IVNKQSC

La secuencia de residuos 150 – 212 de RSV-F se muestran arriba. En la segunda línea, están indicadas las estructuras secundarias de la línea superior con una h (por hélice) y s (por cadenas o hebras) basado en el modelo de homología 3D PIV-5. Las hélices están resaltadas con sombreadas con gris. La línea inferior es la misma secuencia que la que tiene sombreados grises para las hélices basado en la propensión de la hélice de la secuencia.

Por ello, se introdujo una prolina en la posición 175 para estabilizar este giro y para impedir el replegamiento en una hélice que como una mutación individual aumentó el nivel de expresión, lo cual indica que estabiliza la conformación de la prefusión y permite un mejor procesamiento de la proteína. Para el giro en la horquilla (residuos 184, 185) se buscó en la base de datos de Brookhaven una horquilla estructuralmente homóloga de una proteína estable que no se repliega. Se descubrió una gran homología estructural con un bucle de horquilla en la proteína quinasa A (código pdb, 3FHI). De acuerdo con la alineación que se muestra a continuación, se reemplazaron los residuos 184 Gly o 185Val por Asn con el fin de estabilizar este giro e impedir su replegamiento.

VVLSLNGVSVLTSKV HRAb1b2 178-192

EMDVYVNNEWATSVG 3fhi:B 179-193

Estas mutaciones se pueden combinar con otras mutaciones estabilizantes, como N67I y S215P, para obtener el beneficio completo de esta estabilización según se muestra en la Tabla 10.

Residuos de aminoácidos 421, 426 y 46

Los residuos de aminoácidos en las posiciones 421 y 426 se encuentran en un bucle en la región DII. El residuo S46 se encuentra sobre una cadena que cruza de DI a DIII. El residuo de aminoácido en la posición 426 se mutó por serina y el

residuo de aminoácido en la posición 46 se mutó por glicina. Estas mutaciones aumentaron la estabilidad y los niveles de expresión de la prefusión.

Residuo de aminoácido 465

5 El residuo de aminoácido Lys465 se encuentra en otra región que pasa por un gran cambio de conformación. El residuo Lys465 se ubica sobre un bucle entrecruzado que une la parte superior de la región DII con HRB. Dado que la región HRB se mueve hacia arriba desde la parte inferior y hacia la parte superior y forma complejos con HRA para elaborar el haz de seis hélices, el bucle entrecruzador también se reubica desde abajo hacia arriba. Por ello es que este bucle debe ser metaestable para permitir el desprendimiento de DII y su reubicación en otro entorno. El residuo Lys465 sobre el bucle entrecruzado se encuentra cerca de Lys445 sobre la región DII. La mutación de Lys465 ya sea por Gln o Glu neutraliza la repulsión y la mayor estabilidad y niveles de expresión de la F de prefusión.

EJEMPLO 3

Expresión de proteína F de prefusión

15 Se generaron plásmidos de expresión que codifica la proteína F recombinante de prefusión del RSV usando métodos estándar ampliamente conocidos en el arte, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio y PCR. La plataforma de expresión que se utilizó fueron las células 293Freestyle (Life Technologies, Renfreshire, Reino Unido). Las células se transfectaron transitoriamente usando 293Fectin (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivaron en una incubadora sacudidora durante 5 días a 37°C y con 10% de CO₂. El sobrenadante del cultivo se cosechó y centrifugó durante 5 min a 300 g para eliminar las células y detritos celulares. Subsiguientemente, el sobrenadante del centrifugado se sometió a una filtración estéril usando un filtro de vacío de 0.22 µm y se almacenó a 4°C hasta el uso.

EJEMPLO 4

Purificación de proteína F de prefusión del RSV

25 Los polipéptidos recombinante se purificaron usando un protocolo de purificación en 2 pasos aplicando una columna de intercambio catiónico para la purificación inicial y subsiguientemente una columna Superdex200 para el paso de depuración para eliminar los contaminantes residuales. Para el paso inicial de intercambio de iones, se diluyó el sobrenadante del cultivo con 2 volúmenes de NaOAc 50 mM pH 5.0 y se hicieron pasar sobre una columna HiTrap Capto S de 5 ml a 5 ml por minuto. Subsiguientemente, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna (volúmenes de columna) de NaOAc 20 mM, NaCl 50mM, Tween20 al 0.01% (v/v), pH 5 y se eluyó con 2 volúmenes de columna de NaOAc 20 mM, NaCl 1M, Tween20 0.01% (v/v), a pH 5. El eluato se concentró usando una concentradora centrífuga y la proteína se continuó purificando usando una columna Superdex200 usando Tris 40mM, NaCl 500mM, Tween20 0.01% (v/v), a pH 7.4 como solución amortiguadora de pH de corrida. En la Figura 1A se muestra el cromatograma de la columna de filtración en gel y el pico dominante que contiene la proteína F de prefusión del RSV. Las fracciones que contienen este pico se volvieron a combinar y se determinó la concentración de proteína usando OD280 y se almacenó a 4°C hasta el uso. En la Figura 1B se muestra un análisis reducido por SDS-PAGE del preparado final de proteína y, como se puede ver, la pureza fue >95%. La identidad de la banda se verificó usando transferencia de Western y anticuerpos específicos para la proteína F (no se muestra).

EJEMPLO 5

NativePAGE

40 Para la determinación inicial del estado multimérico de los polipéptidos F de prefusión de acuerdo con la invención, se analizaron sobrenadantes provenientes de los cultivos de células transfectadas transitoriamente en un sistema de gel Bis-Tris NativePAGE (Life Technologies). Subsiguientemente los geles se transfirieron usando la tecnología iBlot de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Se usó un anticuerpo CR9503 específico para la proteína F del RSV (secuencias que se dan más adelante en la tabla 17) como sonda primaria para la detección de la proteína F de prefusión del RSV y seguido de a conjugado de HRP IgG de ratón anti-humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) o un conjugado de IRDye800CW y IgG anti-humana (conejo) purificado por afinidad (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA). Las transferencias se revelaron ya sea con estándar película (Kodak) o usando el sistema obtención de imágenes en el infrarrojo Odyssey CLx. La Figura 2 muestra el análisis de sobrenadantes por NativePAGE de la proteína monomérica F4-, (pista 1), la proteína F post-fusión y primariamente trimérica del RSV (pista 2) y la proteína F de prefusión purificada del RSV (pista 3), donde se ve que, después de la purificación en el preparado solo están presentes las especies triméricas en la proteína F de prefusión del RSV porque estas migran de manera similar a la banda del trímero post-fusión. Esto también tiene sustento en el volumen de elución de la columna de filtración en gel (Figura 1A).

EJEMPLO 6

Transferencia de Western cuantitativa

Para la cuantificación de las construcciones de proteína F de prefusión del RSV, se usó una transferencia de Western cuantitativa. Se corrieron diluciones de sobrenadantes de los cultivos reducidas en geles NuPAGE 4-12% (w/v) Bis-Tris (Life Technology) y se transfirieron usando la tecnología iBlot (Life Technology). Las transferencias se sondearon con CR9503 (como se describió anteriormente) y se revelaron ya sea con una IgG conjugada de ratón anti-humano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) o un conjugado IgG anti-humano (conejo) IRDye800CW purificado por afinidad (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA). Luego se estimaron las cantidades de proteína usando una dilución en serie de proteína RSV estándar purificada y ya sea el sistema obtención de imágenes en el infrarrojo Odyssey CLx o a ojo desnudo. En la Figura 3 se pueden ver los efectos con relación a la construcción A2_F24 (SEQ ID N°: 19) en términos de niveles de expresión totales. Se mostró que las mutaciones únicas aumentaron el nivel de expresión hasta en 5 veces. Si se generaron mutantes dobles de algunas de dichas mutaciones se pudieron observar efectos sinérgicos y en algunos casos se observó un aumento adicional de la expresión de hasta 11 veces respecto de A2_F24.

EJEMPLO 7

Ensayo de estabilidad de punto final

La verificación de la conformación de prefusión de los polipéptidos expresados de acuerdo con la invención se realizó usando la tecnología de Interferometría BioLayer (Octet) usando los anticuerpos específicos para prefusión CR9501 o CR9502, o el anticuerpo no específico para conformación CR9503, que comprende las regiones variables de cadena pesada y liviana del Motavizumab. Los anticuerpos se biotinilaron por protocolos estándar y se inmovilizaron en biosensores de estreptavidina (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido). El procedimiento fue el siguiente. Después de la equilibración de los sensores en solución amortiguadora de pH cinética (ForteBio) durante 60s las puntas de los biosensores [Tipss] se transfirieron a PBS con 5 ug/ml del anticuerpo deseado. La carga se llevó a cabo durante 250s. Subsiguientemente se incluyó otro paso de equilibración durante 200s en solución amortiguadora de pH cinética. Por último, las puntas de los biosensores se transfirieron al sobrenadante del cultivo de expresión que contenía los polipéptidos F de prefusión del RSV y se registró la respuesta de unión (nm) después de 1200s. Esta fase se denomina también la fase de asociación. Esto se realizó inmediatamente después de la cosecha (día 1) así como 5 días después (día 5) y la diferencia en la unión de CR9501 se usó como herramienta de selección para identificar mutaciones capaces de estabilizar la conformación de prefusión. Se estimó que una construcción era estable si se observaba menos del 20% de pérdida de unión el día 5 y se estimó que era inestable si se observaba más del 20% de pérdida de unión. Luego, de ser necesario las construcciones estables se pueden someter a pruebas de estabilidad más rigurosas. El análisis de datos se realizó usando el software de análisis de datos ForteBio 6.4 (ForteBio).

EJEMPLO 8

Ensayo de estabilidad térmica

Se estimó el potencial estabilizador de las características que se introducen en los polipéptidos F del RSV por estrés térmico. Para dicho propósito, se calentó el sobrenadante del cultivo de células transfectadas transitoriamente o proteína purificada usando un rango de temperaturas. Subsiguientemente, las muestras se enfriaron sobre hielo para prevenir cambios conformacionales adicionales inducidos por el calor y se sondearon usando el anticuerpo CR9501 en la plataforma de tecnología Octet según se describe en el Ejemplo 7. Se graficaron las respuestas que se obtuvieron al final de la fase de asociación a las diferentes temperaturas en función de la temperatura y se ajustaron por regresión no lineal usando el software Prism. Esto dio como resultado una estimación de la temperatura donde el nivel de unión del anticuerpo es un 50% del máximo y este valor se puede utilizar para comparar diferentes construcciones en términos de la estabilidad térmica prefusión. En la Figura 4 se comparan el ectodominio sin modificar (SEQ ID N°: 13) y la construcción A2_F24 N67I+S215P (SEQ ID N°: 21). Se puede observar que el estrés inducido por la temperatura tiene un menor efecto sobre la construcción A2_F24 N67I+S215P (SEQ ID N°: 21) en comparación con el ectodominio sin modificar. Por ello se puede concluir que los motivos estabilizantes que se introducen en los polipéptidos de acuerdo con la invención, es decir el sitio de trimerización, el conector F1-F2 y las 2 mutaciones puntuales permiten obtener una proteína F de prefusión más estable.

EJEMPLO 9

Ensayo de estabilidad de la fase de asociación

Para evaluar la estabilidad de diversas mutaciones puntuales se desarrolló el ensayo de unión Octet, una variación del ensayo de estabilidad de punto final descrito anteriormente (Ejemplo 7). El análisis de fase de asociación se implementó debido a los niveles de expresión muy altos de algunos mutantes puntuales porque es más riguroso y previene completamente el desplazamiento del nivel de expresión. También se utilizó el anticuerpo CR9501 pero en vez de seleccionar la respuesta de unión al final de la fase de asociación, se usó la curva de asociación completa, para reducir el potencial desplazamiento de la concentración del ensayo de punto final. Esto se realizó usando los puntos de datos de la fase de asociación completa del experimento usando los mutantes puntuales A2_F24 que se indican. Los datos se

compensaron por la cantidad de anticuerpo unido en el chip. Las mediciones se realizaron los días 1, 5 y 33, y se compararon las formas de las curvas de los tres días. Si se obtenían curvas idénticas se estimaba que la construcción era estable y si no, que era inestable. En la Figura 5 se puede ver el análisis de cuatro variantes diferentes. Las construcciones de proteína de prefusión inestables se pueden identificar por una pérdida de unión dependiente del tiempo de CR9501 (A2_F24, K465Q, S46G), mientras que las construcciones estables de prefusión (N67I) no mostraron dicha disminución. La mutación E92D pareció encontrarse dentro de un grupo entre los dos con una estabilidad intermedia porque solo se observaron cambios menores en la forma de la curva. En la Figura 6 se combinaron determinadas mutaciones puntuales para hacer mutantes dobles y se analizaron los mismos. Como se puede ver, las diferentes mutaciones mostraron diferentes fenotipos en términos de estabilidad e inducción de la estabilidad. Cuando los polipéptidos comprenden las mutaciones K465Q o S46G solas o en combinación, todos los tres, es decir los dos mutantes únicos y los mutantes dobles, son inestables y la unión específica con el anticuerpo para prefusión se pierde con el transcurso del tiempo. Cuando se combina la mutación S46G con E92D, que anteriormente se mostró que tiene una estabilidad intermedia como mutación única, no se pudieron observar cambios de la estabilidad, lo que indica que la mutación E92D no puede corregir las construcciones de proteínas inestables. Cuando la mutación N67I se combinó con las mutaciones ya sea S46G o E92D el resultado fue una construcción completamente estable. Esto también se pudo observar cuando la se combinó mutación S215P con la mutación E92D que muestra el singular potencial de dichas dos mutaciones para estabilizar construcciones de prefusión inestables.

EJEMPLO 10

Octet cuantitativa

Para medir la concentración de la proteína F de prefusión del RSV en los sobrenadantes de los cultivos de células, se usó un método basado en Octet cuantitativa. Los anticuerpos CR9501 y CR9503 se biotinilaron por protocolos estándar y se inmovilizaron en biosensores de estreptavidina (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido). Luego de eso, los biosensores recubiertos se bloquearon en sobrenadante del cultivo células simulado. Se llevó a cabo un experimento cuantitativo de la siguiente manera: temperatura 30C, velocidad de sacudidas 1000 rpm, tiempo del ensayo 300 seg. La concentración de la proteína en el sobrenadante del cultivo células se calculó usando una curva estándar. La curva estándar se preparó para cada anticuerpo que se usó para recubrir usando la proteína A2_F24_N67I+S215P (SEQ ID# 21), diluida en sobrenadante del cultivo células simulado. La medición se realizó el día de la cosecha del sobrenadante (día 1) y después de almacenar el sobrenadante a 4C durante 5 días o más. La diferencia en la concentración que se determinó con el CR9501 se usó como herramienta de selección para identificar mutaciones capaces de estabilizar la conformación de prefusión. Se estimó que una construcción era estable si se observaba una disminución de la concentración medida menor al 20% el día 5. El análisis de datos se realizó usando el software de análisis de datos ForteBio 6.4 (ForteBio).

EJEMPLO 11

Análisis por FACS y estabilidad térmica

Se generaron plásmidos de expresión que codifican la proteína F recombinante del RSV de longitud completa usando métodos estándar ampliamente conocidos en el arte, que incluyen mutagénesis dirigida al sitio y PCR. Las células HEK293-T se transfectaron transitoriamente usando 293Fectin (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivaron durante 48 horas a 37oC y 10% de CO2. Las células se desprendieron de cápsulas de cultivo de células usando solución amortiguadora de pH para FACS (EDTA 5 mM, FBS al 1% en PBS), se lavaron y resuspendieron en la misma solución amortiguadora de pH. Las células se tiñeron para la superficie de proteína F del RSV con anticuerpos CR9501 o CR9503 biotinilados, seguido de estreptavidina marcada con APC. Para la discriminación entre células vivas y muertas se agregó yoduro de propidio a la suspensión de células al final del procedimiento de tinción. Las células se analizaron con FACS Canto (BD BioSciences) de acuerdo con métodos estándar bien conocidos por cualquier persona con experiencia en el arte. El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo 9.0 (Tree Star Inc.). Se calculó la intensidad media de la fluorescencia (MFI por las iniciales en inglés de Mean Fluorescence Intensity) para la población de células vivas APC-positivas.

El potencial estabilizador de las características que se introducen en el polipéptido F del RSV de longitud completa unido a membrana se estimó por estrés térmico. Las células se desprendieron de las cápsulas de cultivo de células 48 horas después de la transfección como se describió anteriormente y la suspensión de células se calentó durante 5-10 minutos usando un rango de temperaturas (37, 46, 55.3, 60°C). Subsiguientemente, las células se tiñeron y analizaron por FACS como se describió anteriormente. Se calculó la MFI para la población de células vivas APC-positivas. Se calculó el porcentaje de células APC-positivas para la población de células vivas. La tinción con el CR9503 dio como resultado MFI y % de células APC-positivas similares en muestras sometidas al choque térmico con temperaturas crecientes. La tinción con CR9501 se redujo en muestras de células transfectadas con proteínas inestables. La pérdida de la unión de CR9501 indicó pérdida de la proteína F de prefusión del RSV en la superficie de la célula.

EJEMPLO 12

Evaluación preclínica de inmunogenicidad del polipéptido F de prefusión

Para evaluar la inmunogenicidad de un polipéptido F de prefusión de RSV estabilizado (A2F24,N67I, S215P) (SEQ ID N°: 21) se inmunizaron ratones de acuerdo con la tabla 14 con 0.5 o 5 ug en un régimen de imprimación-refuerzo la semana 0 y la semana 4. Como se muestra en la Figura 7, los ratones inmunizados con polipéptido F de prefusión mostraron mayores títulos de VNA que los ratones inmunizados con polipéptido F de post-fusión de RSV.

5 Tabla 14. Esquema de inmunización

Grupo	Preparado	Dosis	Coadyuvante	N
1	F de posfusión	0.5 µg	-	9
2	F de posfusión	5 µg	-	9
3	F prefusión	0.5 µg	-	9
4	F prefusión	5 µg	-	9
5	F de posfusión	0.5 µg	Poli(I:C)	9
6	F prefusión	0.5 µg	Poli(I:C)	9
8	FI-RSV	1/75	-	8
9	PBS		-	3

Luego, se inmunizaron ratas aldoneras con dos dosis diferentes de RSV-F en la conformación ya sea de post-fusión o de prefusión (Tabla 15). Los animales se inmunizaron i.m. la semana 0 y la semana 4. EN la Figura 8 se muestra un alto título de anticuerpo neutralizante el día de la exposición (semana 7).

Tabla 15. Grupos, inmunógeno y dosis para evaluación de inmunogenicidad y eficacia en ratas aldoneras

Grupo	Preparado	Dosis	Coadyuvante
1	F de posfusión	0.5 ug	-
2	F de posfusión	5 ug	-
3	F prefusión	0.5 ug	-
4	F prefusión	5 ug	-
9	F prefusión	0.5 ug	Poli IC
10	F prefusión	5 ug	Poli IC
11	F prefusión	0.5 ug	Coadyu Fos
12	F prefusión	5 ug	Coadyu Fos
13	Ad26.RSV.FA2	10 ⁸	-
14	PBS	-	-

10 Cinco días después de la exposición se midió la carga viral en pulmón y nariz (véase la Figura 9).

Como se muestra, los polipéptidos F de prefusión de acuerdo con la invención son capaces de inducir una fuerte respuesta inmune de protección que reduce la carga viral en el pulmón y aún en la nariz.

Tabla 16. Aminoácidos estándar, abreviaturas y propiedades

Aminoácido	3 Letras	1 Letra	Polaridad de la cadena lateral	Carga de la cadena lateral (pH 7.4)
Alanina	Ala	A	No polar	Neutro
Arginina	Arg	R	Polar	Positiva

Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo
Cisteína	Cys	C	No polar	Neutro
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro
Glicina	Gly	G	No polar	Neutro
Histidina	His	H	Polar	Positivo (10%) Neutro (90%)
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro
Leucina	Leu	L	No polar	Neutro
Lisina	Lys	K	Polar	Positiva
Metionina	Met	M	No polar	Neutro
Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutro
Prolina	Pro	P	No polar	Neutro
Serina	Ser	S	Polar	Neutro
Treonina	Thr	T	Polar	Neutro
Triptófano	Trp	W	No polar	Neutro
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro
Valina	Val	V	No polar	Neutro

Tabla 17. Secuencias de anticuerpos

Ab	Dominio VH	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
CR950 1	Aminoácidos 1-125 de SEQ ID N°: 53	GASINSDNYWT (SEQ ID N°:54)	HISYTGNTYYTPSLKS (SEQ ID N°:55)	CGAYVLISNCGWFDS (SEQ ID N°:56)
CR950 2	Aminoácidos 1-121 de SEQ ID N°:57	GFTFSGHTIA (SEQ ID N°:58)	WVSTNNGNTEYAQKI QG (SEQ ID N°:59)	EWLVMGGFAFDH (SEQ ID N°:60)

Ab	Dominio VL	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
CR950 1	Aminoácidos 1-107 de SEQ ID N°: 61	QASQDISTYLN (SEQ ID N°: 62)	GASNLET (SEQ ID N°:63)	QQYQYLPYT (SEQ ID N°:64)
CR950 2	Aminoácidos 1-110 de SEQ ID N°: 65	GANNIGSQNVH (SEQ ID N°:66)	DDRDRPS (SEQ ID N°:67)	QVWDSSRDQAVI (SEQ ID N°:68)

A continuación se dan las secuencias de aminoácidos de varias de las construcciones de polipéptidos F de prefusión de RSV. Se hace notar que la numeración de aminoácidos en las diferentes construcciones descritas en la presente se basa en la secuencia de tipo salvaje (SEQ ID N°: 1), que significa que todos los aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición 108 inclusive de las construcciones de prefusión corresponden a las posiciones de los aminoácidos 1-108 de la secuencia de tipo salvaje, mientras que la numeración de los aminoácidos desde la posición 138 hasta el final está desplazada en 22 aminoácidos, es decir L138 en la secuencia de tipo salvaje (SEQ ID N°: 1) corresponde a L116 en

todas las construcciones de prefusión. Esto se debe al hecho de que se ha realizado una delección en las construcciones de prefusión, es decir la inserción del conector GSGSG, la numeración real en F1 no es la misma entre construcciones. Por consiguiente, la numeración que se utiliza con respecto a las mutaciones específicas de acuerdo con la invención, por ejemplo S215P, se refiere a la posición del aminoácido en la secuencia de tipo salvaje.

Secuencias

Secuencia de la proteína F del RSV A2 de longitud completa (SEQ ID NO: 1)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMN
 YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLS
 TNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL
 ITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
 IKEEVLAYVVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGS
 VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQKE
 GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
 TNIMITTIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIASFN

Secuencia de la proteína F del RSV B1 de longitud completa (SEQ ID NO: 2)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRAREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKKRKRRLGFLGVLGVSASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTN
 KAVVLSNGVSVLTSKVLDLKKNYINNQLLPIVNNQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEIN
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNVQIVRQQSYSIMSIK
 EEVLAYVVQPLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNKLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNI
 MITTIIIVIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIASFSK

SEQ ID NO: 3

EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA

SEQ ID NO: 4

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO: 5

GSGSG

F8: RSV A2, ectodominio de tipo salvaje wt (SEQ ID NO: 13)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNVTL SKKRKR RFLGFL LGVGS AIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLS
TNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL E
ITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY SIMSI
IKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS

VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHHHHHHHH

F11: RSV B1, ectodominio de tipo salvaje wt (SEQ ID NO: 14)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKNCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMN
YTINTTKNLNVSISKKRKR RFLGFL LGVGS AIASGIA VSKVLHLEGEVNKIKNALLSTN
KAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPV NKQSCRISNIETVIEFQQKNSRLL E
REFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNVQIVRQQSY SIMSIK
EEV LAYVVQLPIYGVITPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS VSF
FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
GAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKLEGKN
LYVKGEPIINYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHHHHHHHH

F47: RSV A2, estabilizada por conector, IZ(S) (SEQ ID NO: 15)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGS AIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY SIMSIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS VSFPPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP S
EFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGGIEGRHHHHHHHH

F47-: RSV A2, estabilizada por conector, IZ(S) (SEQ ID NO: 16)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDL
NYIDKQLLPIVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNS
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
EFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGG

F43: RSV B1, estabilizada por conector, IZ(S) (SEQ ID NO: 17)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKCNNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSL
GFLLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDL
KNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
SLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFP
DASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGGIEGRHHHHH

F24: RSV B1, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 18)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKCNNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSL
GFLLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDL
KNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
SLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFP
DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGI
EGRHHHHH

A2_F24: RSV A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 19)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

F24-: RSV B1, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 20)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSL
GFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKNALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDL
KNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLL EINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPIYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
SLTL PSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGI
EGR

F24-T67I+S215P: RSV B1, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 22)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKNALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLK
NYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLL EINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPIYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNS
LTL PSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
KTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFPSDEFD
ASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGIE
GR

A2_F24 N67I+E92D: RSV A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 23)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

F24- N671+E92D RSV B1, estabilizada por conector, fbrtitina (SEQ ID NO: 24)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLG
GFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYINNQLLPIV NKQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
SLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGI
EGR

A2_F24 N671+K465Q RSV A2, estabilizada por conector, fbrtitina (SEQ ID NO: 25)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGQSLYVKGEPIINFYDPLVFPSD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

F24- T671+K465Q RSV B1, estabilizada por conector, fbrtitina (SEQ ID NO: 26)

ES 2 715 378 T3

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
NYINNQLLPVNNQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
LLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
KTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGNLYVKGEPIINYYDPLVFPDEFD
ASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGIE
GR

A2_F24 N67I+S46G RSV A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 27)

MELLILKANAITTILTA VTFCAFSGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSL
GFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPVNNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL
GGIEGR

F24- T67I+S46G RSV B1, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 28)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFGALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSL
GFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYINNQLLPVNNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
SLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGNLYVKGEPIINYYDPLVFPDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGI
EGR

A2_F24 E92D+S215P: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 29)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSL
GFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPS
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL
GGIEGR

F24-E92D+S215P: RSV B1, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 30)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSL
GFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKINALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYINNQLLPIVNNQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPS
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL
GGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K508E: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 31)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRE-
SDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+E487I: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 32)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPD
IFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+E487Q: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 33)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPD
QFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL
GGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+E487N: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 34)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPD
NFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL
GGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+D486N: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 35)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK

ES 2 715 378 T3

NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP SN
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K465E: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 36)

MELLILKANAITTIL TAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGESLYVKGEPIINFYDPLVFP SD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K465Q: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 37)

MELLILKANAITTIL TAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGQSLYVKGEPIINFYDPLVFP SD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+N426S: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 38)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASSKNR
GIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE
FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K421N: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 39)

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTNCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K209Q: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 40)

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K201Q: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 41)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN^GSVLTSKVL^{DLK}
NYIDQQLPIV^{NK}QSCSIPNIETVIEFQQKNNR^{LLE}ITREFSVNAGV^{TTP}VSTYMLT^{NSE}
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY^{SIMSIIKEE}VLA^{YVV}QLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICL^{TR}TDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC^{DTM}
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI^VSCYGKTKCTAS^{NKN}
RGI^{IK}TFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV^{NK}QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP^{SD}
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL^{LSA}IGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+V185N: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 42)

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN^NSVLTSKVL^{DLK}
NYIDKQLPIV^{NK}QSCSIPNIETVIEFQQKNNR^{LLE}ITREFSVNAGV^{TTP}VSTYMLT^{NSE}
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY^{SIMSIIKEE}VLA^{YVV}QLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICL^{TR}TDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC^{DTM}
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI^VSCYGKTKCTAS^{NKN}
RGI^{IK}TFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV^{NK}QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP^{SD}
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL^{LSA}IGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+G184N: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 43)

MELLILKANAITTILTA VTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN^NSVLTSKVL^{DLK}
NYIDKQLPIV^{NK}QSCSIPNIETVIEFQQKNNR^{LLE}ITREFSVNAGV^{TTP}VSTYMLT^{NSE}
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY^{SIMSIIKEE}VLA^{YVV}QLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICL^{TR}TDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC^{DTM}
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI^VSCYGKTKCTAS^{NKN}
RGI^{IK}TFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV^{NK}QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP^{SD}
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL^{LSA}IGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+N175P: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 44)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTPKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+E92D: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 45)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K80E: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 46)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIEQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKN
YIDKQLLPIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSEL
LSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFLGGI
EGR

A2_F24 N67I+S215P+K77E: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 47)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIELIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKN
YIDKQLLPVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTNSEL
LSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI
IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFLGGI
EGR

A2_F24 N67I+S215P+S46G: A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 48)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSL
GFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL
GGIEGR

A2_F24: RSV S46G A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 49)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSL
GFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL
GGIEGR

A2_F24: RSV K465Q A2, estabilizada por conector, fibritina (SEQ ID NO: 50)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGQSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24: RSV N67I A2, estabilizada por conector, fribritina (SEQ ID NO: 51)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
RGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLG
GIEGR

A2_F24: RSV E92D A2, estabilizada por conector, fribritina (SEQ ID NO: 52)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSL
GFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA YVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL
GGIEGR

Secuencia de la proteína F del RSV CL57-v224 de longitud completa (SEQ ID NO: 69)

ES 2 715 378 T3

MELPILKTNAITTLAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRRELPRFMN
YTLNNTKNNNVTLSSKKRKRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEG
KSLEYVKGEPINFDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNVGKSTT
NIMITTIIIVIIIVILLLLIAVGLFLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIASFN

Ectodominio, RSV CL57-v224 (SEQ ID NO: 70)

MELPILKTNAITTLAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRRELPRFMN
YTLNNTKNNNVTLSSKKRKRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEG
KSLEYVKGEPINFDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL

PreF, RSV A2, fibritina (SEQ ID NO: 71)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMN
YTLNNAKKTNVTLSSKKRKRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEI
ITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEG
GKSLEYVKGEPINFDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAP
RDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

PreF N67I S215P, RSV A2, fibritina (SEQ ID NO: 72)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRKRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
RDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF T67I S215P, RSV B1, fibrina (SEQ ID NO: 73)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMN
YTINTTKNLNVSISKKRKRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTN
KAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYINNQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNSRLEIN
REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNVQIVRQQSYSIMSIIK
EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKN
LYYVKGEPIINYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPR
GQAYVRKDGWVLLSTFL

RSV N67I S215P, RSV CL57-v224, fibrina (SEQ ID NO: 74)

MELPILKTNAITLAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRELPRFMN
YTLNNTKNNNVTLSSKKRKRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEG
KSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPR
DGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreFL T67I S215P, RSV B1, fibrina, Bucle (SEQ ID NO: 22)

ES 2 715 378 T3

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV VQLPIYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGII
KTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGNLYVKGEPIINYDPLVFPDDEFD
ASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

PreFL N67I S215P, RSV CL57-v224, fibritina, Buclé (SEQ ID NO: 75)

MELPILKTNAITTILAAVTLFCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKN
YIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSEL
LSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV VQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGII
KTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDDEFD
ASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

PreF N67I S215P E487Q, RSV A2, fibritina (SEQ ID NO: 76)

MELLILKANAITTILAVTF CFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRRRFLGFL LGVGSIAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLST
NKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEI
TREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYV VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEA
PRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

PreF N67I S215P K201N, RSV A2, fibritina (SEQ ID NO: 77)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
NKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNIYDNQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
RDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF N67I S215P E92D, RSV A2, fibritina (SEQ ID NO:78)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
NKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
RDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF N67I S215P D486N, RSV A2, fibritina (SEQ ID NO: 79)

MELLILKANAITTILAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
NKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
RDGQAYVRKDGWVLLSTFL

Fwt N67I S215P, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 80)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRRRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQLLPVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
TNIMITTHIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLISKDQLSGINNIASFN

Fsl N67I S215P, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 81)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNS
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPSE
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTHIIVILLSLIAVGLLL
YCKARSTPVTLISKDQLSGINNIASFN

Fwt N67I S215P E92D, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 82)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRRRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKKNYIDKQLLPVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
TNIMITTHIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLISKDQLSGINNIASFN

Fsl N67I S215P E92D, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 83)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLK

ES 2 715 378 T3

NYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHN VNAVKSTTNIMITTHIIVII VILLSLIAVGLLL
YCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN

Fwt N67I S215P E487Q, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 84)

MELLILKANAITTIL TAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVTL SKKRKRFLGFL LGVGSIAIASGVA VSKVLHLEGEV NKIKSALLST
NKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLL E
TREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHN VNAVKST
TNIMITTHIIVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN

Fsl N67I S215P E487Q, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 85)

MELLILKANAITTIL TAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVGSIAIASGVA VSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSE
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPD
QFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHN VNAVKSTTNIMITTHIIVII VILLSLIAVGLLL
YCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN

Fwt N67I S215P D486N, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 86)

ES 2 715 378 T3

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
TLNNAKKTNTVLSKKRRRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPIVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
TNIMITTHIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fsl N67I S215P D486N, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 87)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLG
FLLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLK
NIYDKQLLPIVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNS
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
NSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKN
RGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE
FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTHIIVILLSLIAVGLLL
YCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fwt N67I S215P S46G, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 88)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRRRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPIVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEI
ITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
TNIMITTHIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fsl N67I S215P S46G, F del RSV unida a membrana, A2, (SEQ ID NO: 89)

MELLILKANAITTILTAVTFASFQGNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSL
GFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDL
KNYIDKQLLPVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGHIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVILLSLIAVGLL
LYCKARSTPVTL SKDQLSGINNIAFSN

Cadena pesada de CR9501 (SEQ ID NO: 53):

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSNYWTWIRQRPGGLEWIGHISYTG
NTYYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFDS
WGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Cadena liviana de CR9501 (SEQ ID NO: 61):

EIVMTQSPSSLSASIGDRVITTCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
SRFTGSGYGTDFSVTISSLPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVEIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de CR9502 (SEQ ID NO: 57):

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGGLEWMGWVSTNNG
NTEYAQKIQRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

Cadena liviana de CR9502 (SEQ ID NO: 65):

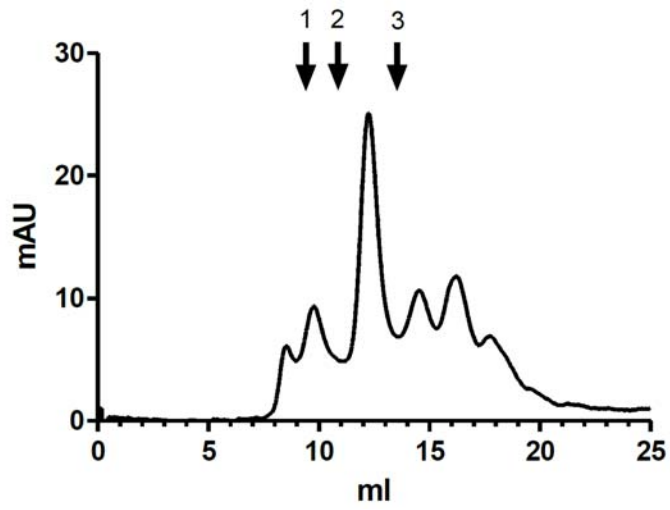
QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDRPSG
IPDRFSGSNGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRDQAVIFGGTKLTVLGQPK
AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión (F) recombinante de prefusión del virus sincicial respiratorio (RSV), que comprende al menos un epitope que presenta especificidad por la proteína de la conformación de prefusión F, donde el al menos un epitope es reconocido por un anticuerpo monoclonal con especificidad por la conformación de prefusión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 54, una región CDR2 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 55, una región CDR3 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 56, una región CDR1 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 62, una región CDR2 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 63 y una región CDR3 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 64, y/o es reconocido por un anticuerpo monoclonal con especificidad por la conformación de prefusión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 58, una región CDR2 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 59, una región CDR3 de la cadena pesada como la que se representa en SEQ ID N° 60, una región CDR1 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 66, una región CDR2 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 67 y una región CDR3 de la cadena liviana como la que se representa en SEQ ID N° 68, donde el polipéptido comprende una mutación del residuo de aminoácido N/T en la posición 67 a I y/o una mutación del residuo de aminoácido S en la posición 215 a P, donde las posiciones de aminoácidos se proporcionan en referencia a la secuencia de la proteína F de RSV de la cepa A2 (SEQ ID NO: 1).
2. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un dominio F1, un dominio F2 y una secuencia de conexión entre el dominio F1 y el dominio F2 que comprende entre 1 y 10 residuos de aminoácidos.
3. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, que comprende un dominio F1 truncado, un dominio F2 y una secuencia de conexión entre el dominio F1 y el dominio F2 que comprende entre 1 y 10 residuos de aminoácidos.
4. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende un dominio de trimerización heterólogo conectado con el dominio F1 truncado.
5. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende al menos una mutación adicional que se selecciona del grupo que consiste en
- (a) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 46,
 - (b) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 77,
 - (c) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 80,
 - (d) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 92,
 - (e) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 175,
 - (f) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 184,
 - (g) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 185,
 - (h) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 201,
 - (i) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 209,
 - (j) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 421,
 - (k) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 426,
 - (l) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 465,
 - (m) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 486,
 - (n) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 487 y
 - (o) una mutación en el residuo de aminoácido en la posición 508.
6. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la reivindicación 5, donde la al menos una mutación adicional se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) una mutación en el residuo de aminoácido S en la posición 46 por un residuo de G,
 - (b) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 77 por un residuo de E,

- (c) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 80 por un residuo de E,
 (d) una mutación en el residuo de aminoácido E en la posición 92 por un residuo de D,
 (e) una mutación en el residuo de aminoácido N en la posición 175 por un residuo de P,
 (f) una mutación en el residuo de aminoácido G en la posición 184 por un residuo de N,
 5 (g) una mutación en el residuo de aminoácido V en la posición 185 por un residuo de N,
 (h) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 201 por un residuo de Q,
 (i) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 209 por un residuo de Q,
 (j) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 421 por un residuo de N,
 (k) una mutación en el residuo de aminoácido N en la posición 426 por un residuo de S,
 10 (l) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 465 por un residuo de E o de Q,
 (m) una mutación en el residuo de aminoácido D en la posición 486 por un residuo de N,
 (n) una mutación en el residuo de aminoácido E en la posición 487 por un residuo de Q, de N o de I y
 (o) una mutación en el residuo de aminoácido K en la posición 508 por un residuo de E.
7. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 6, que
 15 comprende una mutación en el residuo de aminoácido N/T en la posición 67 por un residuo de I, y una mutación en el
 residuo de aminoácido S en la posición 215 por un residuo de P.
8. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 4 a 7, donde el
 dominio de trimerización heterólogo comprende la secuencia de aminoácidos EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID N° 3).
9. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la reivindicación 8, donde el dominio de trimerización está unido
 20 al residuo de aminoácido 495 de la proteína F del RSV.
10. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde el dominio de
 trimerización heterólogo comprende la secuencia de aminoácidos GYIPEAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL (SEQ ID N°
 4).
11. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con la reivindicación 10, donde el dominio de trimerización está
 25 unido al residuo de aminoácido 513 de la proteína F del RSV.
12. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es estable
 durante al menos 30 minutos a 55°C, preferiblemente a 58°C, y más preferiblemente a 60°C.
13. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es estable
 30 después de almacenarlo a 4°C durante al menos 30 días, preferiblemente durante al menos 60 días, más
 preferiblemente durante al menos 6 meses, y aún más preferiblemente durante al menos 1 año.
14. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que
 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 21 a SEQ ID N° 52 y
 SEQ ID N° 71 a 89.
15. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las
 35 reivindicaciones precedentes 1 a 14.
16. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15.
17. Una composición que comprende un polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las
 reivindicaciones 1 a 14, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15 y/o un vector de acuerdo
 con la reivindicación 16.
- 40 18. El polipéptido F de prefusión del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la molécula de ácido
 nucleico de acuerdo con la reivindicación 15 y/o el vector de acuerdo con la reivindicación 16, que pueden usarse para
 inducir una respuesta inmune contra la proteína F del RSV.

A.



B.

kDa

97

64

51

39

28

14

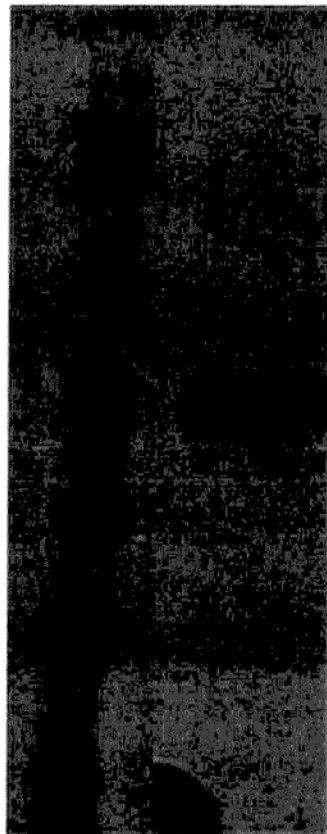


FIG. 1

PAGE nativo

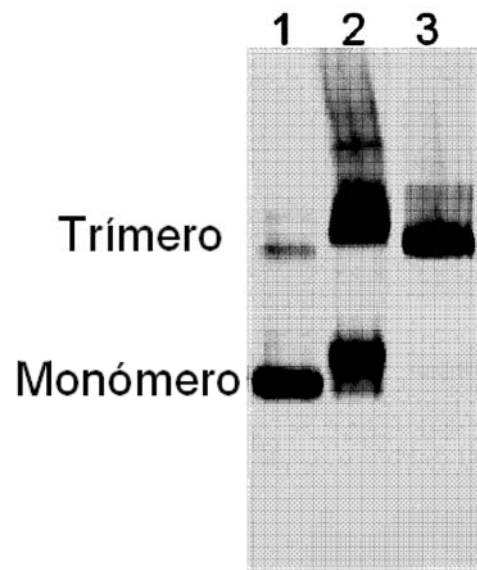
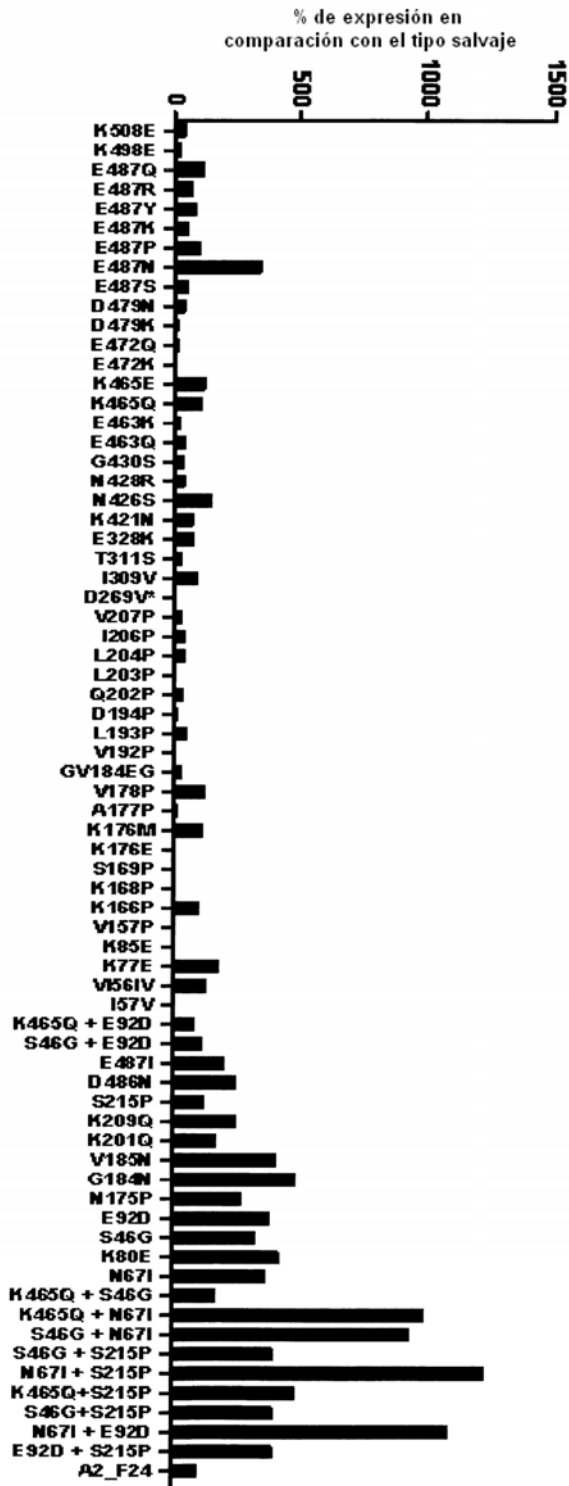


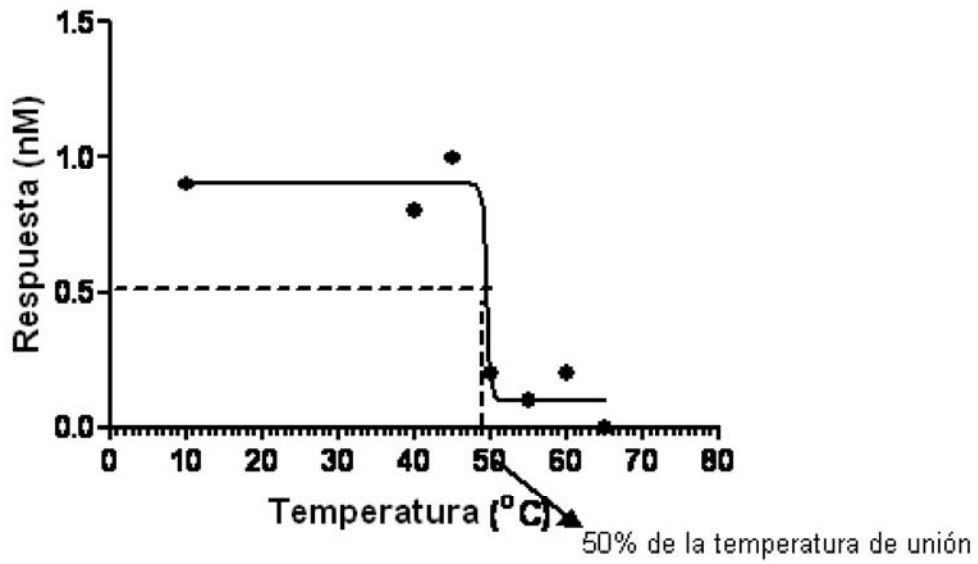
FIG. 2

FIG. 3



A.

Ectodominio de tipo salvaje (variante A2)



B.

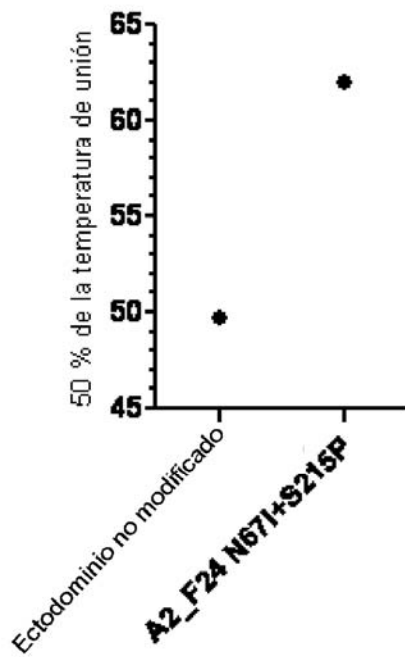
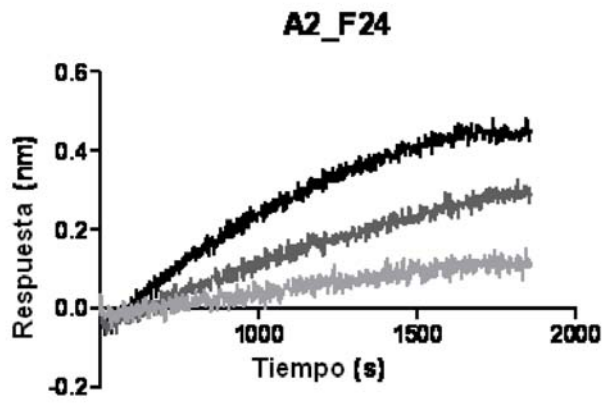
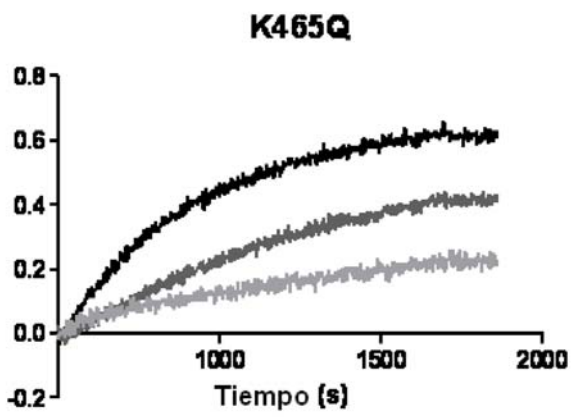


FIG. 4

A.



B.



C.

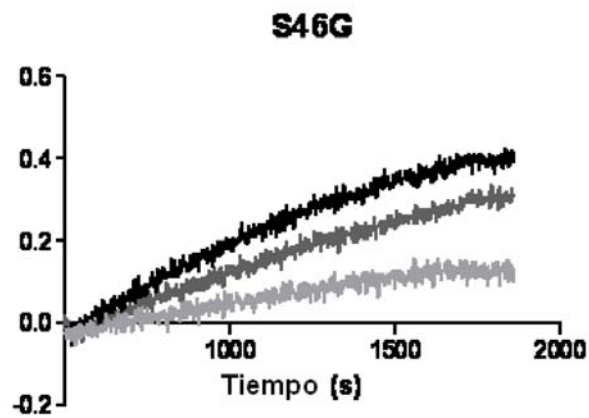
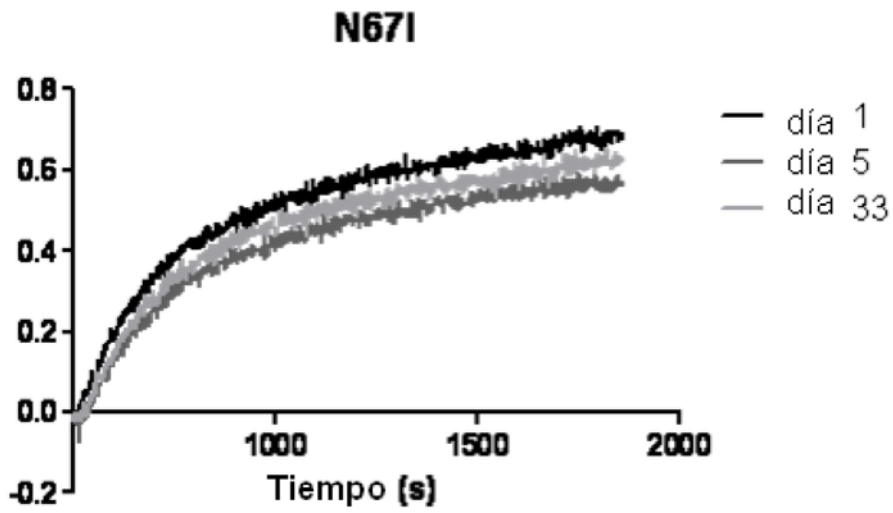


FIG. 5

D.



E.

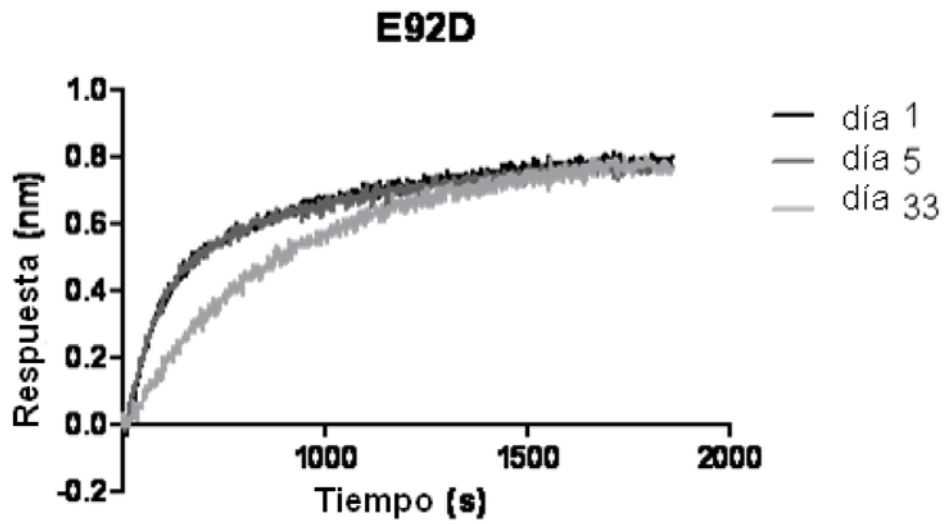


FIG. 5 continuación

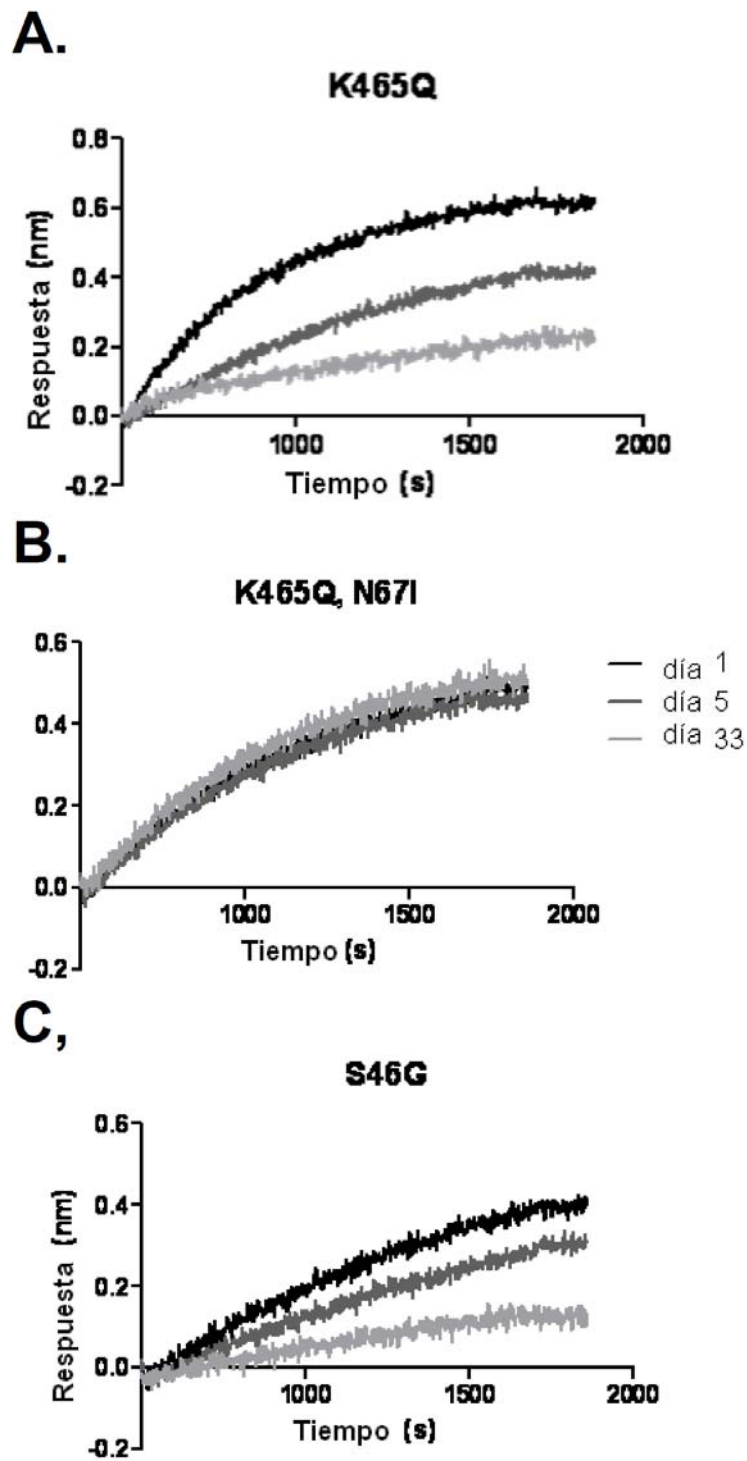
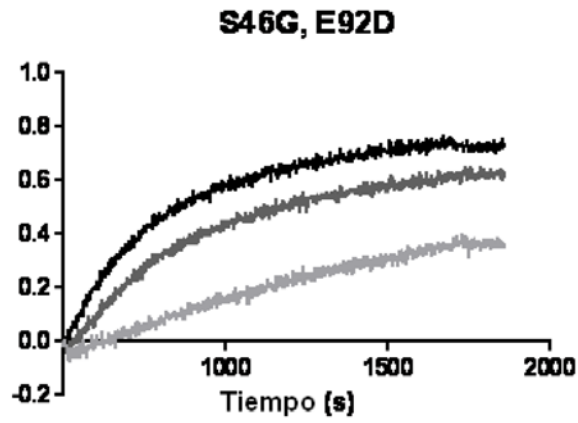
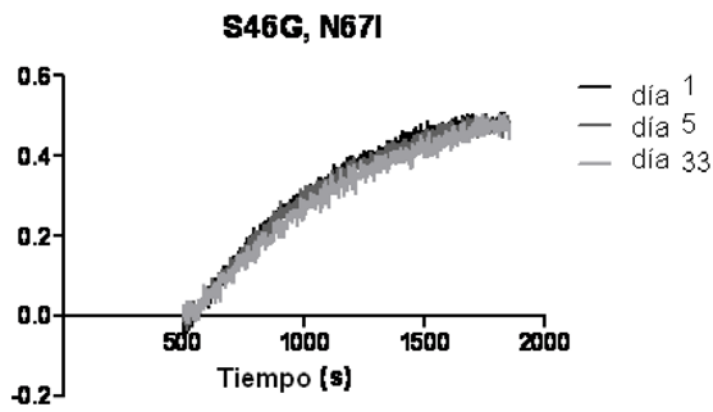


FIG. 6

D.



E.



F.

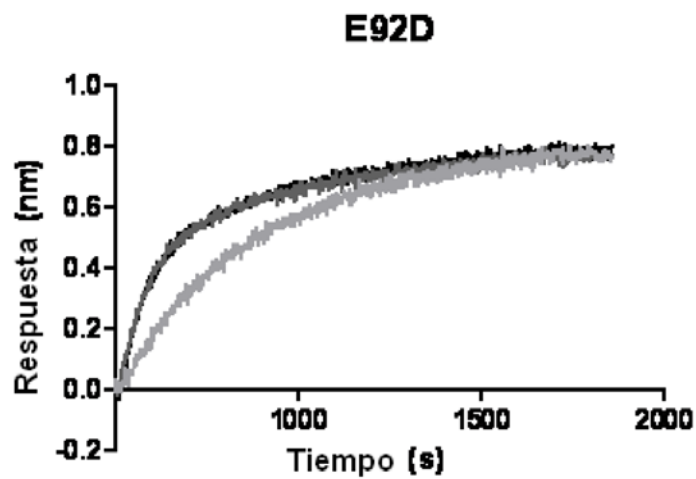
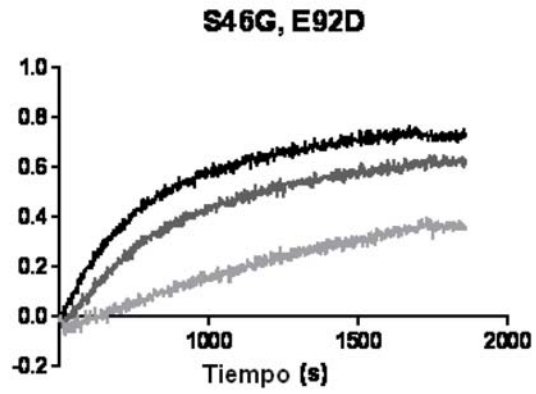
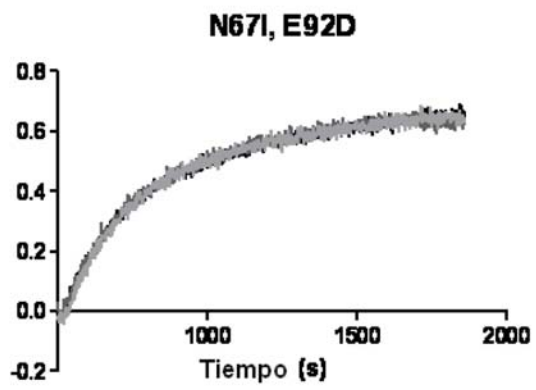


FIG. 6 continuación

G.



H.



I.

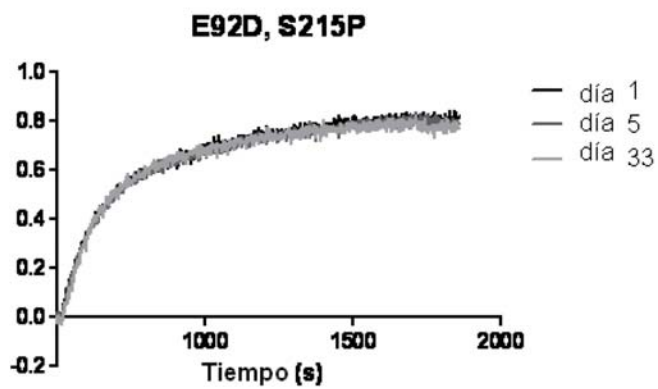


FIG. 6 continuación

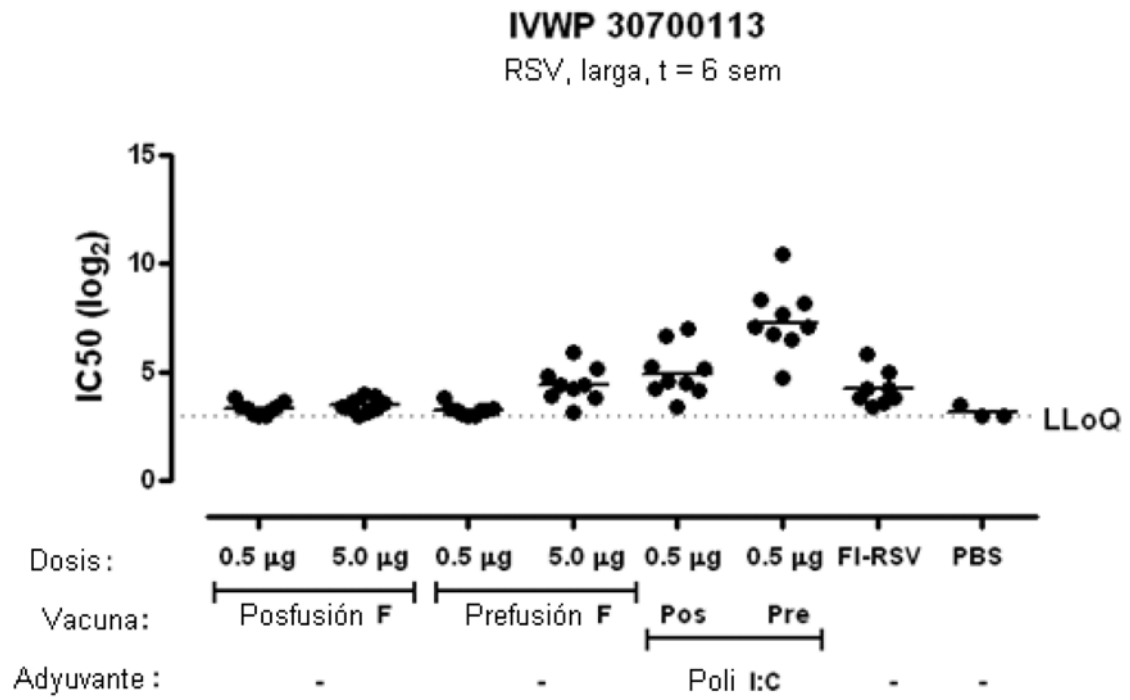


FIG. 7

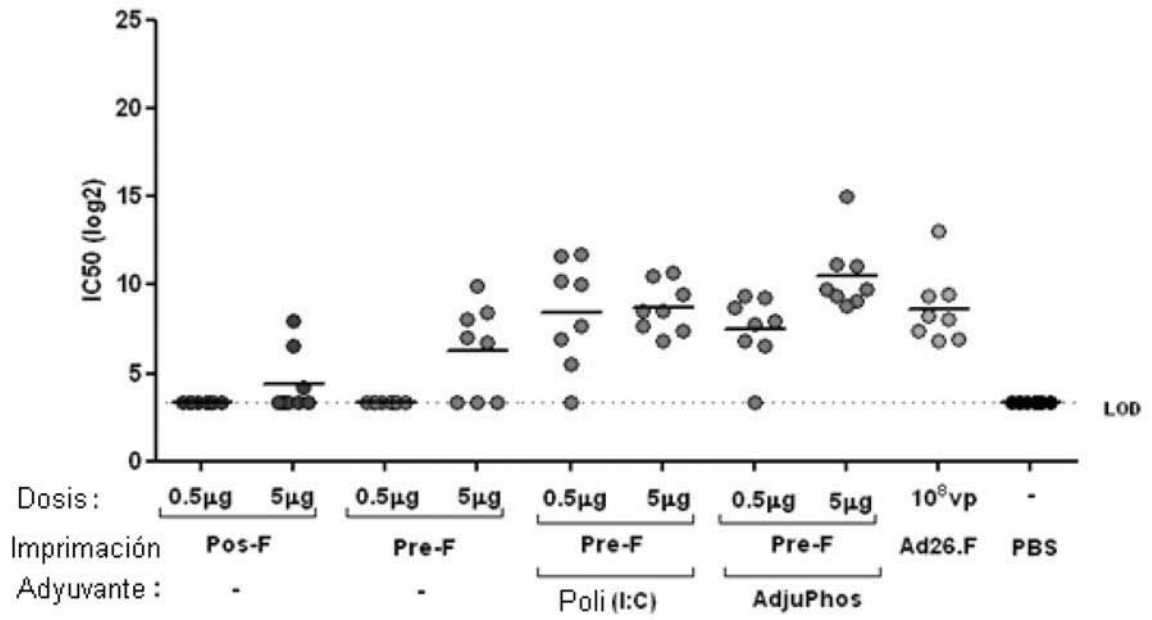


FIG. 8

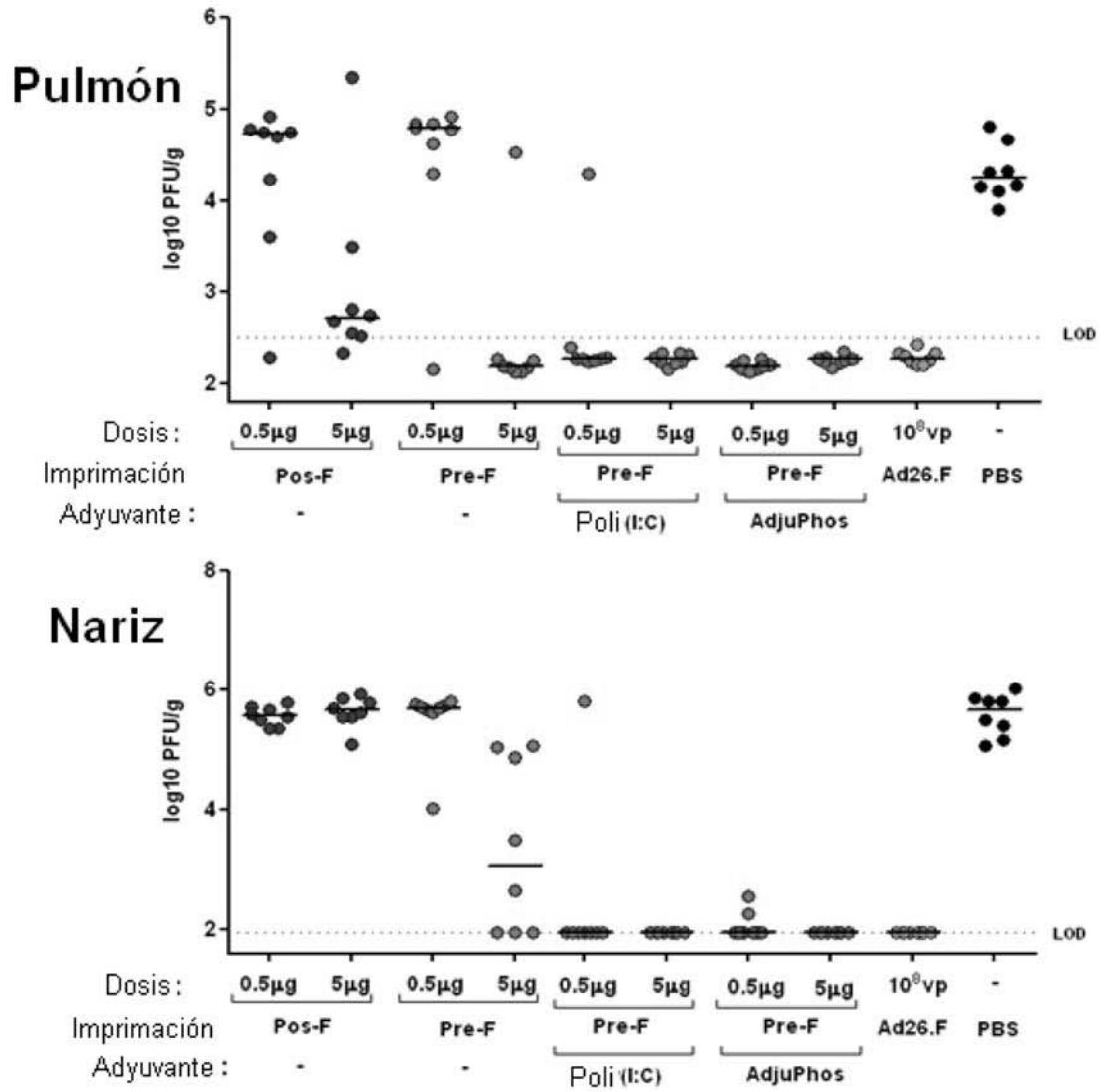


FIG. 9