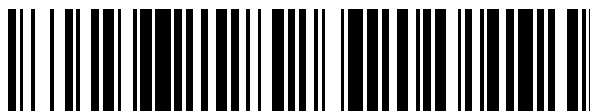


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 762**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2014** **PCT/EP2014/002301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015** **WO15024668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2014** **E 14755336 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3035960**

54 Título: **Vacuna contra el virus respiratorio sincitial (RSV)**

30 Prioridad:

21.08.2013 WO PCT/EP2013/002518

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

11.03.2020

73 Titular/es:

**CUREVAC AG (100.0%)
Paul-Ehrlich-Str. 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**KRAMPS, THOMAS;
SCHNEE, MARGIT;
VOSS, DANIEL y
PETSCH, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN , Ana María

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 747 762 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

Vacuna contra el virus respiratorio sincitial (RSV).

- La presente invención se define en sus reivindicaciones adjuntas y se refiere a una secuencia de ARNm que comprende una región codificante que codifica un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje. Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm tal como se han definido anteriormente. Además, también se describe el uso de la secuencia de ARNm o de la composición que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm para la preparación de una composición farmacéutica, especialmente de una vacuna, por ejemplo para su uso en la profilaxis o el tratamiento de infecciones por RSV. La invención se refiere además a un kit o kit de partes que comprende la secuencia de ARNm o la composición (farmacéutica) aquí descrita. Igualmente, la presente invención además proporciona la secuencia de ARNm, la composición (farmacéutica) o el kit o kit de partes aquí descritos para su uso como un medicamento, en particular para su uso en el tratamiento o la profilaxis de infecciones por RSV.
- La necesidad médica global y el impacto económico del RSV es muy alto. Es la causa más importante de infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (ALRI) que resultan en visitas al hospital durante la lactancia y la primera infancia. Por ejemplo, en Estados Unidos, más del 60% de lactantes están infectados por RSV durante en la primera temporada del RSV y casi todos se han infectado a los 2-3 años de edad. Aproximadamente 2,1 millones de niños estadounidenses menores de 5 años son tratados para la enfermedad del RSV al año: 3% como pacientes hospitalizados, 25% en servicios de urgencias y 73% en consultas pediátricas. A nivel mundial, entre los niños menores de cinco años, el RSV se estima que provoca 33,8 millones de ALRI cada año (más del 22% de todos las ALRI), resultando en 66.000-199.000 muertes, el 99% de las mismas en países en vías de desarrollo. El RSV también es una causa común de enfermedades respiratorias entre los ancianos, provocando muchas hospitalizaciones por gripe en una población fuertemente inmunizada contra la gripe. El RSV se propaga por gotitas respiratorias y por contacto cercano con personas infectadas o con objetos contaminados. En climas templados, hay una epidemia invernal anual. Los lactantes tienen un mayor riesgo de padecer una enfermedad severa por RSV en sus primeros 6 meses y picos de hospitalización a los 2-3 meses de edad. El nacimiento prematuro y la enfermedad cardiopulmonar son factores de riesgo para la enfermedad por RSV severa. La infección por RSV en lactantes produce una inmunidad parcialmente protectora, que parece decaer más rápidamente que la inmunidad contra la mayoría de otros virus respiratorios. La mayoría de los niños infectados con RSV durante su primer año se vuelven a infectar al año siguiente, en general de forma menos severa. Las re-infecciones continúan a lo largo de la vida, a menudo con síntomas del tracto respiratorio superior y a veces con implicación del tracto respiratorio inferior o nasal. El tratamiento recomendado de la bronquiolitis por RSV consiste principalmente en la asistencia respiratoria y la hidratación. No se recomienda una terapia antiviral específica. Se utiliza el anticuerpo monoclonal neutralizante *Palivizumab* para la profilaxis de aquellos lactantes de mayor riesgo de infección severa, pero es demasiado costoso y poco práctico para un uso universal. Actualmente, no existe una vacuna autorizada contra el RSV y el desarrollo de una vacuna contra el RSV segura y efectiva es una prioridad de en la salud pública global.
- En un ensayo de vacunas en los años 60', se inmunizaron lactantes y niños pequeños con una preparación del virión completo de RSV inactivado en formalina (FIRSV) o con una preparación equivalente de paramixovirus (FPIV). El cinco por ciento de los sujetos inmunizados con FI-PIV y luego infectados de forma natural con RSV durante la siguiente temporada del RSV fueron hospitalizados; el 80% de aquellos inmunizados con FI-RSV y luego infectados por RSV fueron hospitalizados y murieron dos niños. Este aumento de infección por RSV debido a la vacunación es un problema específico del desarrollo de vacunas frente a infecciones por RSV (revisado en Shaw *et al.* Curr Opin Virol. junio 2013; 3(3):332-42. doi: 10.1016/j.coviro.2013.05.003. Epub 30 de mayo de 2013).

- Por tanto, las infecciones por el virus respiratorio sincitial (RSV) constituyen la mayor necesidad de vacunación en lactantes no satisfecha en los países desarrollados y una importante necesidad insatisfecha de vacunación en lactantes a nivel mundial. Más de 40 años de esfuerzos todavía no han dado como resultado una vacuna autorizada del RSV para seres humanos.

En resumen, el RSV, perteneciente a la familia de virus *Paramyxoviridae*, es uno de los patógenos más contagiosos y contribuye de forma sustancial a las infecciones severas del tracto respiratorio en lactantes, ancianos y pacientes inmunodeprimidos.

- 5 Como se mencionó anteriormente, actualmente el único producto profiláctico en el mercado es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la proteína de superficie F viral recomendado para lactantes considerados de alto riesgo, incluyendo lactantes prematuros y lactantes con enfermedad pulmonar crónica (The IMPact-RSV Study Group. 1998. Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants. *Pediatrics*, 102(3), pp.531-537, Tablan *et al.* 2003. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report*. Recommendations and Reports/Centers for Disease Control, 53(RR-3), pp.1-36).

- 15 Las proteínas F y G del RSV son necesarias para la infectividad del virus y se ha encontrado que la cola citoplásmica de la proteína F juega un papel crucial en la localización celular de la proteína F y en la generación de la progenie del virus infeccioso (Oomens *et al.* 2006. *J. Virol.* 80(21):10465-77). Estudios recientes con modelos animales ha demostrado que una cantidad suficiente de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la proteína F del RSV limitan la replicación viral, conduciendo a un curso menos severo de la enfermedad (Singh, S.R. *et al.*, 2007. Immunogenicity and efficacy of recombinant RSV-F vaccine in a mouse model. *Vaccine*, 25(33), S.6211-6223., Zhan, X. *et al.*, 2007. Respiratory syncytial virus (RSV) F protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. *Vaccine*, 25(52), pp. 8782-8793., Vaughan, K., *et al.*, 2005. DNA immunization against respiratory syncytial virus (RSV) in infant rhesus monkeys. *Vaccine*, 23(22), pp. 2928-2942).

- 25 Además, se podría demostrar que es necesaria una función equilibrada de las células T reguladoras y efectoras para el aclaramiento viral y mitigar la gravedad de la enfermedad (Liu, J. *et al.*, 2010. Epitope-specific regulatory CD4 T cells reduce virus-induced illness while preserving CD8 T-cell effector function at the site of infection. *Journal of Virology*, 84(20), pp. 10501-10509).

- 30 Además del anticuerpo monoclonal humanizado mencionado anteriormente, se ha desarrollado virus atenuados vivos en vacunas que producen una fuerte respuesta inmunitaria, pero que no se recomiendan para su uso en grupos objetivo específicos (lactantes, niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos). También se han utilizado vectores de ADN que expresa la proteína F del RSV que porta los epítomos de células B para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. En este contexto, la WO 2008/077527 y la WO 96/040945 describen vectores que comprenden secuencias de ADN que codifican la proteína F del RSV para su uso como vacunas. Sin embargo, el uso de un ADN como vacuna puede ser peligroso debido a una inserción no deseada en el genoma, que potencialmente conduce a la interrupción de genes funcionales y a cáncer o a la formación de anticuerpos anti-ADN. La WO 2012/116714 describe vacunas que comprenden un ARNm codificador de antígeno para su uso en pacientes ancianos.

- 40 Por tanto, el objetivo que subyace en la invención es proporcionar una secuencia de ARNm que codifica para péptidos o proteínas antigénicos del virus respiratorio sincitial (RSV) para su uso como vacunas en la profilaxis o el tratamiento de infecciones por RSV, en particular en lactantes, ancianos y pacientes inmunodeprimidos.

Estos objetivos se resuelven mediante el contenido de las reivindicaciones anexas. En particular, los objetivos que fundamentan la presente invención se resuelven, de acuerdo con un primer aspecto, mediante una secuencia de ARNm de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

- 45 Por claridad y legibilidad, se proporciona la siguiente información científica y definiciones de la técnica. En el contexto de esta descripción, se pueden proporcionar definiciones y explicaciones adicionales.

- 50 Sistema inmunitario: El sistema inmunitario puede proteger a los organismos de infecciones. Cuando un patógeno penetra una barrera física de un organismo y se introduce en él, el sistema inmunitario innato proporciona una respuesta inmediata, aunque no específica. Cuando los patógenos evaden esta respuesta innata, los vertebrados tienen una segunda barrera de protección, el sistema inmunitario adaptativo. Aquí, el sistema inmunitario adapta su respuesta durante una infección para mejorar su reconocimiento del patógeno. Esta respuesta mejorada luego es retenida, después de que el patógeno se haya eliminado, en forma de una memoria inmunológica y permite que el sistema inmunitario adaptativo organice ataques más rápidos y fuertes cada vez que se encuentra con este patógeno. Así, el sistema inmunitario comprende el

sistema inmunitario innato y el adaptativo. Cada una de estas dos partes contiene los denominados componentes humorales y celulares.

5 Respuesta inmunitaria: Una respuesta inmunitaria típicamente puede ser una reacción específica del sistema inmunitario adaptativo a un antígeno particular (denominada respuesta inmunitaria específica y adaptativa) o una reacción no específica del sistema inmunitario innato (denominada respuesta inmunitaria no específica o innata). La invención se refiere esencialmente a reacciones específicas (respuestas inmunitarias adaptativas) del sistema inmunitario adaptativo. En particular, se refiere a respuestas inmunitarias adaptativas a infecciones virales, como por ejemplo a infecciones por RSV. Sin embargo, esta respuesta específica puede estar apoyada por una reacción no específica adicional (respuesta inmunitaria innata). Por tanto, la invención también se refiere a un compuesto para una estimulación simultánea del sistema inmunitario innato y el adaptativo con el fin de provocar una respuesta inmunitaria adaptativa eficiente.

15 Sistema inmunitario adaptativo: El sistema inmunitario adaptativo está compuesto por células sistémicas altamente especializadas y por procesos que eliminan o evitan el crecimiento de patógenos. La respuesta inmunitaria adaptativa proporciona al sistema inmunitario del vertebrado la capacidad de reconocer y recordar patógenos específicos (para generar inmunidad) y de organizar ataques más fuertes cada vez que se encuentra el patógeno. El sistema es altamente adaptable debido a una hipermutación somática (un proceso que aumenta la frecuencia de las mutaciones somáticas) y la recombinación V(D)J (recombinación genética irreversible de segmentos de genes receptores antigénicos). Este mecanismo permite que un pequeño número de genes genere un vasto número de diferentes receptores antigénicos, que luego se expresan únicamente en cada linfocito individual. Debido a que la redistribución genética conduce a un cambio irreversible en el ADN de cada célula, toda la progenie (descendencia) de esa célula heredará entonces los genes que codifican para la misma especificidad del receptor, incluyendo células B de memoria y células T de memoria, que son las claves para una inmunidad específica duradera. La teoría de la red

20

25 inmunitaria es una teoría de cómo funciona el sistema inmunitario adaptativo basada en las interacciones entre las regiones variables de los receptores de las células T, las células B y las moléculas producidas por las células T y las células B que tienen regiones variables.

Respuesta inmunitaria adaptativa: La respuesta inmunitaria adaptativa típicamente se entiende como específica de antígeno. La especificidad antigénica permite generar respuestas que se adaptan a antígenos, patógenos o células infectadas por patógenos específicos. La capacidad de organizar estas respuestas adaptadas es retenida en el cuerpo mediante las "células de memoria". Si un patógeno infecta el cuerpo más de una vez, estas células de memoria específicas se utilizan para eliminarlo rápidamente. En este contexto, el primer paso de una respuesta inmunitaria adaptativa es la activación de células T naive específicas de antígeno o de diferentes células inmunitarias capaces de inducir una respuesta inmunitaria

30

35 específica de antígeno mediante células presentadoras de antígenos. Esto sucede en los tejidos linfoides y en los órganos por los que las células T naives están pasando constantemente. Los tipos celulares que pueden servir como células presentadoras de antígeno son, entre otras, células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función distinta para producir respuestas inmunitarias. Las células dendríticas capturan antígenos mediante fagocitosis y macropinocitosis y se estimulan mediante el contacto con, por ejemplo un antígeno extraño para migrar al tejido linfóide local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos particulados, tales como bacterias, y son inducidos por agentes infecciosos u otros estímulos adecuados para expresar moléculas MHC. La capacidad única de las células B de unirse e internalizar antígenos de proteína solubles vía sus receptores también puede ser importante para inducir células T. La presentación del antígeno sobre moléculas MHC

40

45 conduce a la activación de las células T, lo cual provoca su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante de las células T efectoras es la eliminación de las células infectadas mediante células T citotóxicas CD8⁺ y la activación de macrófagos mediante células Th1, que conjuntamente constituyen la inmunidad mediada por células, y la activación de las células B mediante células tanto Th2 como Th1 para producir diferentes clases de anticuerpos, dirigiendo así la respuesta inmunitaria humoral. Las células T reconocen un antígeno mediante sus receptores de células T, que no reconocen ni se unen directamente al antígeno, sino que, en su lugar, reconocen fragmentos peptídicos cortos, por ejemplo de antígenos proteínicos derivados de patógenos, que se unen a las moléculas MHC sobre la superficie de otras células.

50

55 Inmunidad celular/respuesta inmunitaria celular: La inmunidad celular se refiere típicamente a la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y a la liberación de diversas citoquinas en respuesta a un antígeno. De forma más general, la inmunidad celular no se relaciona con anticuerpos, sino con la activación de las células del sistema inmunitario. Una respuesta inmunitaria celular se caracteriza, por ejemplo, por activar los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que son capaces de inducir la apoptosis en las células corporales que tienen epítomos de un antígeno en

su superficie, tales como células infectadas por virus, células con bacterias intracelulares y células cancerosas que presentan antígenos tumorales; activar macrófagos y células asesinas naturales, que les permiten destruir patógenos; y estimular células para secretar diversas citoquinas que influyen en la función de otras células implicadas en las respuestas inmunitarias adaptativa e innata.

- 5 Inmunidad humoral/respuesta inmunitaria humoral: La inmunidad humoral se refiere típicamente a la producción de anticuerpos y a los procesos adicionales que puedan acompañarla. Una respuesta inmunitaria humoral típicamente se puede caracterizar, por ejemplo, por la activación de Th2 y la producción de citoquinas, la formación de centros germinales y la conmutación de isotipos, la maduración de afinidad y la generación de células de memoria. La inmunidad humoral típicamente también puede se refiere a las
10 funciones efectoras de los anticuerpos, incluyendo la neutralización de patógenos y toxinas, la activación complementaria clásica y la promoción de la fagocitosis por opsonina y la eliminación de patógenos.

- Sistema inmunitario innato: El sistema inmunitario innato, también conocido como sistema inmunitario no específico, comprende las células y los mecanismos de defienden al huésped de una infección por otros organismos de forma no específica. Esto significa que las células del sistema innato reconocen y responden a patógenos de forma genérica, pero a diferencia del sistema inmunitario adaptativo, no confiere inmunidad o protección a largo plazo al huésped. El sistema inmunitario innato se puede activar, por ejemplo, mediante
15 ligandos de efectores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), por ejemplo receptores tipo Toll (TLR) u otras sustancias auxiliares, como lipopolisacáridos, TNF-alfa, ligando CD40, o citoquinas, monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta, TNF-alfa, factores de crecimiento y hGH, un ligando del receptor tipo Toll humano TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando del receptor tipo Toll murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13, un ligando del receptor tipo NOD,
25 un ligando de un receptor tipo RIG-1, un ácido nucleico inmunoestimulador, un ARN inmunoestimulador (ARNis), un CpG-ADN, un agente antibacteriano o un agente antiviral. Típicamente, una respuesta del sistema inmunitario innato incluye reclutar células inmunitarias hacia los sitios de infección mediante la producción de factores químicos, incluyendo mediadores químicos especializados, denominados citoquinas; activar la cascada complementaria; identificar y eliminar sustancias extrañas presentes en
30 órganos, tejidos, sangre y linfa mediante glóbulos blancos especializados; activar el sistema inmunitario adaptativo mediante un proceso conocido como presentación de antígenos y/o actuar como una barrera física y química frente a agentes infecciosos.

- Adyuvante/componente adyuvante: Un adyuvante o un componente adyuvante en el sentido más amplio es típicamente un agente (por ejemplo, farmacológico o inmunológico) o una composición que pueda modificar, por ejemplo mejorar, la eficacia de otros agentes, tales como un fármaco o una vacuna. Convencionalmente, el término se refiere, en el contexto de la invención, a un compuesto o composición que sirve como vehículo o sustancia auxiliar para inmunógenos y/u otros compuestos farmacéuticamente activos. Se debe interpretar en un amplio sentido y se refiere a un amplio espectro de sustancias que son capaces de
35 aumentar la inmunogenicidad de los antígenos incorporados en o co-administrados con el adyuvante en cuestión. En el contexto de la presente invención, un adyuvante preferentemente mejorará el efecto inmunogénico específico de los agentes activos de la presente invención. Típicamente, “adyuvante” o “componente adyuvante” tienen el mismo significado y se puede utilizar indistintamente. Los adyuvantes se pueden dividir, por ejemplo, en inmuno-potenciadores, sistemas de suministro antigénico o combinaciones de los mismos.

- 45 El término “adyuvante” se entiende típicamente como sin comprender agentes que confieren inmunidad por sí mismos. Un adyuvante ayuda al sistema inmunitario de forma no específica a mejorar la respuesta inmunitaria específica de antígeno, por ejemplo estimulando la presentación de un antígeno al sistema inmunitario o induciendo una respuesta inmunitaria innata no específica. Además, un adyuvante preferentemente puede, por ejemplo, modular la respuesta inmunitaria específica de antígeno mediante, por ejemplo, un desplazamiento de la respuesta específica de antígeno basada en Th2 dominante a una
50 respuesta específica de antígeno más basada en Th1 o viceversa. Así, un adyuvante puede modular favorablemente la expresión/secreción de citoquinas, la presentación de antígenos, el tipo de respuesta inmunitaria, etc.

- ARN inmunoestimulador: Un ARN inmunoestimulador (ARNis) en el contexto de la invención típicamente puede ser un ARN capaz de inducir una respuesta inmunitaria innata por sí mismo. Normalmente no tiene un marco de lectura abierto y, así, no proporciona un antígeno peptídico o un inmunógeno, pero produce una respuesta inmunitaria innata, por ejemplo al unirse a un tipo específico de receptor tipo Toll (TLR) o a otros receptores adecuados. Sin embargo, por supuesto, también los ARNm que tienen un marco de lectura

abierto y que codifican para un/a péptido/proteína (por ejemplo con una función antigénica) pueden inducir una respuesta inmunitaria innata.

Antígeno: De acuerdo con la presente invención, el término “antígeno” se refiere típicamente a una sustancia que pueda ser reconocida por el sistema inmunitario y que es capaz de activar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, por ejemplo mediante la formación de anticuerpos o células T específicas de antígeno, como parte de una respuesta inmunitaria adaptativa. Un antígeno puede ser una proteína o un péptido. En este contexto, el primer paso de la respuesta inmunitaria adaptativa es la activación de las células T específicas de antígeno mediante células presentadoras de antígeno. Esto sucede en los tejidos linfoides y en los órganos a través de los cuales las células T naive están pasando constantemente. Los tres tipos celulares que pueden servir como células presentadoras de antígeno son células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función distinta en la producción de respuestas inmunitarias. Las células dendríticas tisulares capturan antígenos mediante fagocitosis y macropinocitos y son estimuladas por la infección a migrar hacia el tejido linfóide local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos particulados, tales como bacterias, y son inducidos por los agentes infecciosos para expresar moléculas MHC clase II. La capacidad única de las células B de unirse e internalizar antígenos de proteínas solubles vía sus receptores puede ser importante para inducir células T. La presentación del antígeno en moléculas MHC conduce a la activación de las células T, lo que induce su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante de las células T efectoras es la eliminación de las células infectadas mediante las células T citotóxicas CD8⁺ y la activación de macrófagos mediante las células Th1, que conjuntamente constituyen la inmunidad mediada por células, y la activación de células B mediante células tanto Th2 como Th1 para producir diferentes clases de anticuerpos, dirigiendo así la respuesta inmunitaria humoral. Las células T reconocen un antígeno mediante sus receptores de células T, que no reconocen ni se unen al antígeno directamente, sino que, en su lugar, reconocen fragmentos peptídicos cortos, por ejemplo de antígenos proteínicos de patógenos, que se unen a las moléculas MHC en la superficie de otras células.

Las células T se dividen en dos clases principales que tienen diferentes funciones efectoras. Las dos clases se distinguen por la expresión de las proteínas de superficie celular CD4 y CD8. Estos dos tipos de células T difieren en la clase de molécula MHC que reconocen. Existen dos clases de moléculas MHC, moléculas MHC clase I y clase II, que difieren en su estructura y patrón de expresión sobre los tejidos del cuerpo. Las células T CD4⁺ se unen a las moléculas MHC de clase II y las células T CD8⁺ a las moléculas MHC de clase I. Las moléculas MHC de clase I y clase II tienen distinta distribución entre las células, que refleja las diferentes funciones efectoras de las células T que las reconocen. Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos de origen citosólico y nuclear, por ejemplo, a partir de patógenos, comúnmente virus, a las células T CD8⁺, que se diferencian en células T citotóxicas especializadas en eliminar cualquier célula que reconozcan específicamente. Casi todas las células expresan moléculas MHC de clase I, aunque el nivel de expresión constitutiva varía de un tipo de célula a otro. Pero no sólo los péptidos patogénicos procedentes de virus son presentados mediante moléculas MHC de clase I, también son presentados por éstas antígenos tumorales de tipo auto-antígenos. Las moléculas MHC de clase I se unen a péptidos procedentes de proteínas degradadas en el citosol y transportas al retículo endoplásmico. Las células T CD8⁺ que reconocen los complejos MHC de clase I: péptido en la superficie de las células infectadas están especializadas en eliminar cualesquiera células que tengan péptidos extraños y libran así al cuerpo de las células infectadas con virus y otros patógenos citosólicos. La función principal de las células T CD4⁺ (células T auxiliares CD4⁺) que reconocen las moléculas MHC de clase II es activar otras células efectoras del sistema inmunitario. De esta forma, las moléculas MHC de clase II normalmente se encuentran en los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, células que participan en las respuestas inmunitarias, pero no en otras células tisulares. Los macrófagos, por ejemplo, son activados para eliminar los patógenos intravesiculares que albergan y las células B secretan inmunoglobulinas contra moléculas extrañas. Se evita que las moléculas MHC de clase II se unan a péptidos en el retículo endoplásmico y de esta forma las moléculas MHC de clase II se unen a péptidos provenientes de proteínas que se degradan en los endosomas. Capturan péptidos a partir de patógenos que han ingresado al sistema vesicular de macrófagos o a partir de antígenos internalizados mediante células dendríticas inmaduras o los receptores de inmunoglobulina de células B. Los patógenos que se acumulan en grandes cantidades dentro de los macrófagos y las vesículas de células dendríticas tienden a estimular la diferenciación de las células TH1, mientras que los antígenos extracelulares tienden a estimular la producción de las células TH2. Las células TH1 activan las propiedades microbicidas de los macrófagos e inducen las células B para que los anticuerpos IgG sean muy eficaces opsonizando los patógenos extracelulares por la ingesta mediante células fagocíticas, mientras que las células TH2 inician la respuesta humoral activando las células B naive para secretar IgM e inducen la producción de anticuerpos débilmente opsonizantes, tales como IgG1 e IgG3 (ratón) e IgG2 y IgG4 (humano), así como IgA e IgE (ratón y humano).

Epítopo (también denominado “determinante de antígeno”): Los epítomos de células T o partes de las proteínas en el contexto de la presente invención pueden comprender preferentemente fragmentos con una longitud de entre aproximadamente 6 hasta aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo fragmentos según se procesan y presentan mediante las moléculas MHC de clase I, preferentemente con una longitud entre aproximadamente 8 hasta aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 o 10, (o incluso 11 o 12 aminoácidos), o fragmentos tal como son procesados y presentados mediante las moléculas MHC de clase II, preferentemente con una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse los fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos típicamente son reconocidos por las células T y forman un complejo consistente en el fragmento peptídico y una molécula MHC.

Los epítomos de células B típicamente son fragmentos localizados en la superficie externa de antígenos proteínicos o peptídicos (nativos) como se definen aquí, preferentemente con 5 a 15 aminoácidos, con mayor preferencia de 5 a 12 aminoácidos, incluso con mayor preferencia de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por los anticuerpos, es decir, en su forma nativa.

Estos epítomos de proteínas o péptidos además se pueden seleccionar de cualquiera de las variantes aquí mencionadas de estas proteínas o péptidos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítomos conformacionales o discontinuos compuestos por segmentos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como se define aquí, pero que se agrupan en la estructura tridimensional, o son epítomos continuos o lineales, compuestos por una sola cadena polipeptídica.

Vacuna: Una vacuna típicamente se entiende como un material profiláctico o terapéutico que proporciona al menos un antígeno o una función antigénica. El antígeno o la función antigénica puede estimular el sistema inmunitario adaptativo del cuerpo para proporcionar una respuesta inmunitaria adaptativa.

ARNm proporcionador de antígeno: Un ARNm proporcionador de antígeno en el contexto de la invención típicamente puede ser un ARNm con al menos un marco de lectura abierto que se puede traducir mediante una célula u organismo al que se ha proporcionado ese ARNm. El producto de esta traducción es un péptido o proteína que puede actuar como un antígeno, de preferencia como un inmunógeno. El producto también puede ser una proteína de fusión compuesta por más de un inmunógeno, por ejemplo una proteína de fusión que consiste en dos o más epítomos, péptidos o proteínas derivados de las mismas o diferentes proteínas virales, donde los epítomos, péptidos o proteínas pueden estar unidos mediante secuencias enlazantes.

ARNm Bi-/multi-cistrónico: El ARNm típicamente puede tener dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) marcos de lectura abiertos (ORF). Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de varios tripletes (codones) de nucleótidos que se pueden traducir en un péptido o proteína. La traducción de este ARNm proporciona dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) productos de traducción distintos (siempre que los ORF no sean idénticos). Para la expresión en eucariotas, estos ARNm pueden comprender, por ejemplo, una secuencia de sitio de entrada ribosómico interno (IRES).

Estructura 5'-CAP: Una 5'-CAP típicamente es un nucleótido modificado, en particular un nucleótido guanina, añadido en el extremo 5' de una molécula de ARNm. Preferentemente, la 5'-CAP se añade utilizando un enlace 5'-5'-trifosfato (también denominado m7GpppN). Otros ejemplos de estructuras 5'-CAP incluyen glicerilo, residuo (parte) desoxi abásico invertido, 4',5'-metilen-nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil)nucleótido, 4'-tionucleótido, nucleótido carbocíclico, 1,5-anhidrohexitol-nucleótido, L-nucleótidos, alfa-nucleótidos, nucleótidos base modificados, treo-pentofuranosil-nucleótido, 3',4'-seco-nucleótido acíclico, 3,4-dihidroxibutil-nucleótido acíclico, 3,5-dihidroxipentil-nucleótido acíclico, residuo 3'-3'-invertido de nucleótido, residuo 3'-3'-invertido abásico, residuo 3'-2'-invertido de nucleótido, residuo 3'-2'-invertido abásico, 1,4-butandiol-fosfato, 3'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexilfosfato, 3'-fosfato, 3'-fosfotioato, fosfoditioato, o un residuo metilfosfonato puente o no puente. En el contexto de la presente invención, estas estructuras 5'-CAP modificadas pueden utilizarse para modificar la secuencia de ARNm inventiva. Otras estructuras 5'-CAP modificadas que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención son CAP1 (metilación de la ribosa del nucleótido adyacente a m7GpppN), CAP2 (metilación de la ribosa del 2º nucleótido en la dirección 3' del m7GpppN), CAP3 (metilación de la ribosa en el 3º nucleótido en la dirección 3' del m7GpppN), CAP4 (metilación de la ribosa del 4º nucleótido en la dirección 3' del m7GpppN), ARCA (análogo CAP anti-inverso), ARCA modificado (por ejemplo ARCA modificado con fosfotioato), inosina, N1-metilguanosina, 2'-fluoroguanosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoguanosina, 2-aminoguanosina, LNA-guanosina y 2-azidoguanosina.

Fragmentos de proteínas: Los “fragmentos” de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención típicamente pueden comprender una secuencia de una proteína o péptido como se define aquí que, con respecto a su secuencia de aminoácidos (o a su molécula de ácido nucleico codificada), está truncado de forma N-terminal y/o C-terminal en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína original (nativa) (o su molécula de ácido nucleico codificada). Tal truncamiento puede existir ya sea a nivel aminoácido o a nivel ácido nucleico. Una identidad de secuencia con respecto a tal fragmento como se define aquí, por tanto, preferentemente puede hacer referencia a la proteína o al péptido total como se define aquí o a la molécula de ácido nucleico completa (codificante) de esta proteína o péptido.

Los fragmentos de proteínas o péptidos en el contexto de la presente invención pueden comprender además una secuencia de proteína o péptido como se define aquí con una longitud de, por ejemplo, al menos 5 aminoácidos, de preferencia una longitud de al menos 6 aminoácidos, preferentemente al menos 7 aminoácidos, con mayor preferencia al menos 8 aminoácidos, incluso con mayor preferencia al menos 9 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 10 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 11 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 12 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 13 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 14 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 15 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 16 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 17 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 18 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 19 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 20 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 25 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 30 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 35 aminoácidos; incluso con mayor preferencia al menos 50 aminoácidos; o con total preferencia al menos 100 aminoácidos. Por ejemplo, tal fragmento puede tener una longitud entre aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo los fragmentos tal como son procesados y presentados por las moléculas MHC de clase I preferentemente tienen una longitud entre aproximadamente 8 y aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 o 10 (o incluso 6, 7, 11 o 12 aminoácidos), o los fragmentos tal como son procesados y presentados por las moléculas MHC de clase II preferentemente tienen una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, pudiendo seleccionarse estos fragmentos de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos típicamente son reconocidos por las células T en forma de un complejo consistente en el fragmento peptídico y una molécula MHC, es decir, los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma natural. Los fragmentos de proteínas o péptidos pueden comprender al menos un epítipo de estas proteínas o péptidos. Además, también los dominios de una proteína, similares al dominio extracelular, el dominio intracelular o el dominio transmembrana y las versiones acortadas o truncadas de una proteína se puede entender comprendidos en un fragmento de una proteína.

Variantes de proteínas: Las “variantes” de proteínas o péptidos como se definen en el contexto de la presente invención se pueden generar con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia original en una o más mutaciones, tal como uno o más aminoácidos sustituidos, insertados y/o suprimidos. De preferencia, estos fragmentos y/o variantes tienen la misma función biológica o actividad específica en comparación con la proteína natural de longitud total, por ejemplo su propiedad antigénica específica. Las “variantes” de proteínas o péptidos como se definen en el contexto de la presente invención pueden comprender sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con su secuencia natural, es decir su secuencia fisiológica no mutada. Estas secuencias de aminoácidos, así como sus secuencias nucleotídicas codificantes, están en particular bajo el término de variantes como se define aquí. Las sustituciones donde los aminoácidos que se intercambian por otros de la misma clase se denominan sustituciones conservadoras. En particular, se trata de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales cargadas positiva o negativamente, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden participar en puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales con una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido con una cadena lateral polar es reemplazado por otro aminoácido que tiene asimismo una cadena lateral polar, o, por ejemplo, un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrofóbica se sustituye por otro aminoácido que también tiene una cadena lateral hidrofóbica (por ejemplo serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Son posibles inserciones y sustituciones, en particular en esas posiciones de secuencia que no provocan una modificación de la estructura tridimensional o que no afectan la región de enlace. Las modificaciones de una estructura tridimensional mediante inserciones o deleciones se pueden determinar fácilmente por ejemplo utilizando espectroscopía CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, en: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger *et al.* (ed.), Elsevier, Amsterdam).

Una “variante” de una proteína o péptido puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de aminoácidos en un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 aminoácidos de tal proteína o péptido.

Además, las variantes de proteínas o péptidos como se definen aquí que pueden ser codificadas por una molécula de ácido nucleico también pueden comprender aquellas secuencias donde los nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico codificante se intercambian de acuerdo con la degeneración del código genético sin conducir a una alteración de la secuencia respectiva de aminoácidos de la proteína o péptido, es decir, la secuencia de aminoácidos o al menos parte de la misma pueden no diferir de la secuencia original en una o más mutaciones dentro del significado anterior.

Identidad de secuencia: Para determinar el porcentaje en que dos secuencias son idénticas, por ejemplo las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos como se definen aquí, preferentemente las secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de ácido nucleico del vehículo polimérico como se define aquí o las secuencias de aminoácidos por sí mismas, dichas secuencias se pueden alinear para ser posteriormente comparadas entre sí. Así, por ejemplo, una posición de una primera secuencia se puede comparar con la posición correspondiente de la segunda secuencia. Si una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo componente (residuo) que en una posición en la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esa posición. Si este no es el caso, las secuencias difieren en esta posición. Si existen inserciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar espacios en la primera secuencia para permitir un alineamiento adicional. Si existen deleciones en la segunda secuencia en comparación con la primera secuencia, se pueden insertar espacios en la segunda secuencia para permitir una alineación adicional. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas es entonces función del número de posiciones idénticas divididas entre el número total de posiciones, incluyendo aquellas posiciones que sólo están ocupadas en una secuencia. El porcentaje en que dos secuencias son idénticas se puede determinar utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, aunque pero no limitativo, de algoritmo matemático a utilizar es el algoritmo de Karlin *et al.* (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 o Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Este algoritmo está integrado en el programa BLAST. Las secuencias que son idénticas a las secuencias de la presente invención en cierto grado se pueden identificar mediante este programa.

Derivado de una proteína o péptido: Un derivado de un péptido o proteína típicamente se debe entender como una molécula que se deriva de otra molécula, tal como ese péptido o proteína. Un "derivado" de un péptido o proteína también abarca fusiones que comprenden un péptido o proteína utilizados en la presente invención. Por ejemplo, la fusión comprende una etiqueta, tal como, por ejemplo, un epítipo, por ejemplo un epítipo FLAG o V5. Por ejemplo, el epítipo es un epítipo FLAG. Tal etiqueta es útil, por ejemplo, para purificar la proteína de fusión.

ARNm monocistrónico: Un ARNm monocistrónico típicamente puede ser un ARNm que codifica sólo para un marco de lectura abierto. Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de varios tripletes (codones) de nucleótidos que se pueden traducir en un péptido o proteína.

Ácido nucleico: El término ácido nucleico significa cualquier molécula de ADN o ARN y se utiliza de manera sinónima a polinucleótidos. Donde quiera que se haga referencia aquí a un ácido nucleico o a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína y/o péptido particular, el ácido nucleico o la secuencia de ácido nucleico, respectivamente, preferentemente también comprende secuencias reguladoras que permiten su expresión en un huésped adecuado, por ejemplo un ser humano, es decir, la transcripción y/o traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína o péptido particular.

Péptido: Un péptido es un polímero de monómeros aminoácidos. Normalmente, los monómeros están unidos por enlaces peptídicos. El término "péptido" no limita la longitud de la cadena polimérica de los aminoácidos. En algunas realizaciones de la presente invención, un péptido puede contener, por ejemplo, menos de 50 unidades monoméricas. Los péptidos más largos también se denominan polipéptidos, típicamente de 50 a 600 unidades monoméricas, más específicamente de 50 a 300 unidades monoméricas.

Cantidad farmacéuticamente efectiva: Una cantidad farmacéuticamente efectiva en el contexto de la invención típicamente se debe entender como una cantidad que es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria.

Proteína: Una proteína típicamente consiste en uno o más péptidos y/o polipéptidos plegados en una forma tridimensional, facilitando una función biológica.

Secuencia poli(C): Una secuencia poli(C) es típicamente una secuencia larga de nucleótidos de citosina, típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos de citosina, de preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de citosina, con mayor preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nucleótidos de citosina o incluso con mayor preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 o incluso de aproximadamente 20 a aproximadamente 30

nucleótidos de citosina. Preferentemente, una secuencia poli(C) puede estar ubicada 3' de la región codificante comprendida en el ácido nucleico.

- 5 Cola poli-A: Una cola poli-A, también denominada "cola 3'-poli(A)" típicamente es una secuencia larga de nucleótidos de adenosina de hasta aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, por ejemplo entre aproximadamente 25 y aproximadamente 400, de preferencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 400, con mayor preferencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 250, con total preferencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina, añadidos al extremo 3' de un ARN.

- 10 Ácido nucleico estabilizado: Un ácido nucleico estabilizado típicamente presenta una modificación que aumenta la resistencia a la degradación *in vivo* (por ejemplo degradación por una exo- o endo-nucleasa) y/o a la degradación *ex vivo* (por ejemplo por el proceso de fabricación antes de administrar la vacuna, por ejemplo durante la preparación de la solución de vacuna a administrar). La estabilización del ARN se puede alcanzar, por ejemplo, proporcionando una estructura 5'-CAP, una cola poli(A) o cualquier otra modificación de UTR. También se puede conseguir por una modificación estructural o modificando el contenido en G/C
- 15 del ácido nucleico. En el contexto de la invención son concebibles otros diversos métodos conocidos en la técnica.

Portador/portador polimérico: Un portador en el contexto de la invención típicamente puede ser un compuesto que facilite el transporte y/o la complejación de otro compuesto. Dicho portador puede formar un complejo con dicho otro compuesto. Un portador polimérico es un portador formado por un polímero.

- 20 Componente catiónico: El término "componente catiónico" típicamente se refiere a una molécula cargada que está cargada positivamente (catión) a un valor pH típico de aproximadamente 1 a 9, de preferencia un pH de o inferior a 9 (por ejemplo 5 a 9), o inferior a 8 (por ejemplo 5 a 8), o inferior a 7 (por ejemplo 5 a 7), con mayor preferencia a valores pH fisiológicos, por ejemplo de aproximadamente 7,3 a 7,4. Así, un péptido, proteína o polímero catiónico de acuerdo con la presente invención está cargado positivamente en
- 25 condiciones fisiológicas, en particular en las condiciones fisiológicas salinas de la célula *in vivo*. Preferentemente, un péptido o proteína catiónico contiene un gran número de aminoácidos catiónicos, por ejemplo un mayor número de Arg, His, Lys u Orn que otros residuos aminoácidos (en particular más aminoácidos catiónicos que residuos aminoácidos aniónicos similares a Asp o Glu), o contiene bloques formados predominantemente por residuos aminoácidos catiónicos. La definición "catiónico" puede hacer
- 30 referencia a componentes "policatiónicos".

Vehículo: Un agente, por ejemplo un portador, que típicamente se puede utilizar dentro de una composición farmacéutica o vacuna para facilitar la administración de los componentes de la composición farmacéutica o vacuna a un individuo.

- 35 Región no traducida 3' (3'UTR): Una 3'UTR típicamente es la parte de un ARNm localizada entre la región codificante de proteínas (es decir, el marco de lectura abierto) y la secuencia poli(A) del ARNm. Una 3'UTR del ARNm no se traduce en una secuencia de aminoácidos. La secuencia 3'UTR en general está codificada por el gen que es transcrito en el ARNm respectivo durante el proceso de expresión génica. La secuencia genómica se transcribe primero en un ARNm pre-maduro, que comprende intrones opcionales. El ARNm pre-maduro luego se procesa adicionalmente en un ARNm maduro en un proceso de maduración. Este proceso de maduración comprende el paso de terminar en una estructura CAP-5', eliminar los intrones del
- 40 ARNm pre-maduro para eliminar los intrones opcionales y las modificaciones del extremo 3', tal como la poliadenilación del extremo 3' del ARNm pre-maduro y segmentaciones opcionales por endo- o exo-nucleasas, etc. En el contexto de la presente invención, una 3'UTR corresponde a una secuencia de un ARNm maduro que está localizada 3' al codón de parada de la región codificante de proteínas, preferentemente inmediatamente 3' al codón de parada de la región codificante de proteínas, y que se extiende al lado 5' de la secuencia poli(A), preferentemente al nucleótido inmediatamente 5' a la secuencia poli(A). El término "corresponde a" significa que la secuencia 3'UTR puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia de ARNm utilizada para definir la secuencia 3'UTR, o una secuencia de ADN que corresponda a dicha secuencia de ARN. En el contexto de la presente invención, el término "una 3'UTR de un gen", tal como "una 3'UTR de un gen de albúmina", es la secuencia que corresponde a la 3'UTR del ARNm maduro derivado de este gen, es decir, el ARNm obtenido mediante la transcripción del gen y la maduración del ARNm pre-maduro. El término "3'UTR de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de ARN de la 3'UTR.
- 45
- 50

- 55 Región no traducida 5' (5'UTR): Una 5'-UTR típicamente se entiende como una sección particular del ARN mensajero (ARNm). Está localizada 5' del marco de lectura abierto del ARNm. Típicamente, la 5'UTR inicia con el sitio de inicio de la transcripción y termina un nucleótido antes del codón de inicio del marco de lectura

abierto. La 5'-UTR puede comprender elementos de control de la expresión génica, también denominados elementos reguladores. Tales elementos reguladores pueden ser, por ejemplo, sitios de unión ribosómica o un tracto de oligopirimidina 5'-terminal. La 5'UTR se puede modificar pos-transcripcionalmente, por ejemplo por la adición de una 5'-CAP. En el contexto de la presente invención, una 5'UTR corresponde a la secuencia de un ARNm maduro localizada entre el extremo 5'-CAP y el codón de inicio. Preferentemente, la 5'UTR corresponde a la secuencia que se extiende desde un nucleótido ubicado 3' al extremo 5'-CAP, preferentemente del nucleótido ubicado inmediatamente 3' al extremo 5'-CAP a un nucleótido ubicado 5' al codón de inicio de la región codificante de proteínas, preferentemente al nucleótido ubicado inmediatamente 5' al codón de inicio de la región codificante de proteínas. El nucleótido ubicado inmediatamente 3' al extremo 5'-CAP de un ARNm maduro típicamente corresponde al sitio de inicio de la transcripción. El término "corresponde a" significa que la secuencia 5'UTR puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia de ARNm utilizado para definir la secuencia de 5'UTR, o una secuencia de ADN que corresponde a esta secuencia de ARN. En el contexto de la presente invención, el término "una 5'UTR de un gen", tal como "una 5'UTR de un gen TOP", es la secuencia que corresponde a la 5'UTR del ARNm maduro derivado de dicho gen, es decir, el ARNm obtenido mediante la transcripción del gen y la maduración del ARNm pre-maduro. El término "5'UTR de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de ARN de la 5'UTR.

Tracto de oligopirimidina 5' terminal (TOP): El tracto de oligopirimidina 5' terminal (TOP) típicamente es un tramo de nucleótidos de pirimidina localizada en la región 5'-terminal de una molécula de ácido nucleico, tal como la región 5'-terminal de ciertas moléculas de ARNm o la región 5'-terminal de una entidad funcional, por ejemplo la región transcrita, de ciertos genes. La secuencia se inicia con una citidina, que normalmente corresponde al sitio de inicio de la transcripción, y está seguida por un tramo normalmente de aproximadamente 3 a 30 nucleótidos de pirimidina. Por ejemplo, la TOP puede comprender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o incluso más nucleótidos. El tramo de pirimidinas y así la 5'TOP termina en un nucleótido 5' al primer nucleótido de purina aguas abajo de la TOP. El ARN mensajero que contiene un tracto de oligopirimidina 5' terminal con frecuencia se denomina ARNm TOP. Por ejemplo, los genes que proporcionan estos ARN mensajeros se denominan genes TOP. Se han encontrado secuencias TOP, por ejemplo, en genes y ARNm que codifican para factores de alargamiento peptídico y proteínas ribosómicas.

Motivo TOP: En el contexto de la presente invención, un motivo TOP es una secuencia de ácido nucleico que corresponde a una 5'TOP como se definió anteriormente. Así, un motivo TOP en el contexto de la presente invención preferentemente es un tramo de nucleótidos pirimidina con una longitud de 3-30 nucleótidos. De preferencia, el motivo TOP consiste en al menos 3 nucleótidos pirimidina, de preferencia al menos 4 nucleótidos pirimidina, de preferencia al menos 5 nucleótidos pirimidina, con mayor preferencia al menos 6 nucleótidos, con mayor preferencia al menos 7 nucleótidos, con total preferencia al menos 8 nucleótidos pirimidina, donde el tramo de nucleótidos de pirimidina preferentemente se inicia en su extremo 5' con un nucleótido citosina. En los genes TOP y los ARNm TOP, el motivo TOP preferentemente se inicia en el extremo 5' al sitio de inicio transcripcional y termina en un nucleótido 5' al primer residuo de purina del gen o del ARNm. Un motivo TOP en el sentido de la presente invención preferentemente se ubica en el extremo 5' de una secuencia que representa una 5'UTR o en el extremo 5' de una secuencia que codifica para una 5'UTR. Así, preferentemente, un tramo de 3 o más nucleótidos de pirimidina se denomina "motivo TOP" en el sentido de la presente invención si dicho tramo se localiza en el extremo 5' de una secuencia respectiva, tal como el ARNm inventivo, al elemento 5'UTR del ARNm inventivo, o la secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP como se describe aquí. En otras palabras, un tramo de 3 o más nucleótidos de pirimidina que no esté ubicado en el extremo 5' de una 5'UTR o de un elemento 5'UTR, sino en cualquier sitio dentro de una 5'UTR o de un elemento 5'UTR preferentemente no se denomina "motivo TOP".

Gen TOP: Los genes TOP típicamente se caracterizan por la presencia de un tracto de oligopirimidina 5' terminal. Además, la mayoría de los genes TOP se caracterizan por una regulación traduccional asociada al crecimiento. Sin embargo, también se conocen genes TOP con una regulación traduccional específica de tejido. Como se definió anteriormente, la 5'UTR de un gen TOP corresponde a la secuencia de una 5'UTR de un ARNm maduro derivado de un gen TOP, que preferentemente se extiende desde el nucleótido ubicado 3' al extremo 5'-CAP hasta el nucleótido ubicado 5' hacia el codón de inicio. Una 5'UTR de un gen TOP típicamente no comprende ningún codón de inicio, preferentemente no AUG aguas arriba (uAUG) o marcos de lectura abiertos aguas arriba (uORF). Aquí, los AUG aguas arriba y los marcos de lectura abiertos aguas arriba típicamente se entienden como los AUG y los marcos de lectura abiertos que existen 5' al codón de inicio (AUG) del marco de lectura abierto a traducir. Las 5'UTR de los genes TOP en general son bastante cortas. La longitud de las 5'UTR de genes TOP pueden variar de 20 nucleótidos a 500 nucleótidos y típicamente tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos, de preferencia menos de aproximadamente 150 nucleótidos, con mayor preferencia menos de aproximadamente 100 nucleótidos. 5'UTR ilustrativas de los genes TOP en el sentido de la presente invención son las secuencias de ácido

nucleico que se extienden desde el nucleótido en la posición 5 hasta el nucleótido ubicado inmediatamente 5' al codón de inicio (por ejemplo ATG) en las secuencias de acuerdo con las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 14221-1363 de la solicitud de patente PCT/EP2012/002448, WO2013/143700, u homólogos o variantes de las mismas, cuya descripción se incorpora con la misma como referencia. En este contexto un fragmento particularmente preferente de una 5'UTR de un gen TOP es una 5'UTR de un gen TOP que carece del motivo 5'TOP. El término "5'UTR de un gen TOP" preferentemente se refiere a la 5'UTR de un gen TOP de origen natural.

Fragmento de una secuencia de ácido nucleico, en particular de ARNm: Un fragmento de una secuencia de ácido nucleico consiste en un tramo continuo de nucleótidos que corresponden a un tramo continuo de nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico de longitud total que es la base de la secuencia de ácido nucleico del fragmento, que representa al menos el 20%, de preferencia al menos 30%, con mayor preferencia al menos 40%, de con preferencia al menos 50%, incluso con mayor preferencia al menos 60%, incluso con mayor preferencia al menos 70%, incluso con mayor preferencia al menos 80% y con la máxima preferencia al menos el 90% de la secuencia de ácido nucleico de longitud total. Tal fragmento, en el sentido de la presente invención, preferentemente es un fragmento funcional de la secuencia de ácido nucleico de longitud total.

Variante de una secuencia de ácido nucleico, en particular ARNm: Una variante de una secuencia de ácido nucleico se refiere a una variante de secuencias de ácido nucleico que forma la base de una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico variante puede exhibir una o más delecciones, inserciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de ácido nucleico de la cual se deriva. De preferencia, una variante de una secuencia de ácido nucleico es al menos un 40%, de preferencia al menos 50%, con mayor preferencia al menos 60%, con mayor preferencia al menos 70%, incluso con mayor preferencia al menos 80%, incluso con mayor preferencia al menos 90%, con la máxima preferencia al menos un 95% idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la se deriva la variante. Preferentemente, la variante es una variante funcional. Una "variante" de una secuencia de ácido nucleico puede tener al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de nucleótidos con respecto a un tramo de 10, 20, 30, 50, 75 o 100 nucleótidos de tal secuencia de ácido nucleico.

Homólogo de una secuencia de ácido nucleico: El término "homólogo" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a las secuencias de otras especies distintas a la secuencia particular. Es particularmente preferente que la secuencia de ácido nucleico sea de origen humano y, por tanto, que el homólogo sea un homólogo de una secuencia de ácido nucleico humano.

Inyección por chorro: El término "inyección por chorro" como se utiliza aquí se refiere a un método de inyección sin aguja donde un fluido que contiene al menos una secuencia de ARNm inventivo y opcionalmente excipientes adecuados adicionales se hace pasar a través de un orificio, generando así una corriente ultra-fina de líquido a alta presión que es capaz de penetrar la piel de un mamífero y, dependiendo de los ajustes de la inyección, el tejido subcutáneo o el tejido muscular. En principio, la corriente de líquido provoca un agujero en la piel, a través del cual se impulsa la corriente de líquido al tejido diana. Preferentemente, la inyección por chorro se utiliza para la inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular de la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención. En una realización preferida, la inyección por chorro se utiliza para la inyección intramuscular del ARNm inventivo. En una realización preferida adicional, la inyección por chorro se utiliza para la inyección intradérmica del ARNm inventivo.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de los presentes inventores de que una secuencia de ARNm que comprende una región codificante que codifica para al menos un péptido o proteína antigénico del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje induce respuestas inmunes específicas de antígeno y, por tanto, evitan o al menos minimizan las infecciones por el virus respiratorio sincitial (RSV). Fue muy sorprendente para los inventores que la secuencia de ARNm inventiva indujera al menos las mismas respuestas inmunitarias que las vacunas basadas en RSV inactivado, que consiste en el virus completo. Incluso más sorprendentemente, la secuencia de ARNm inventiva como se define en las reivindicaciones inducía células T CD8+ específicas de antígeno, al contrario que una vacuna basada en RSV inactivado. Adicionalmente, en un modelo de inoculación de RSV en ratas algodóneras, los títulos virales en la nariz y en el pulmón de los animales vacunados con el ARNm fueron mucho más bajos en comparación con los de los animales vacunados con las vacunas basadas en un virus RSV inactivado. Con respecto a la seguridad, los inventores podrían

demostrar que la vacuna del RSV basada en ARNm no sugería la mejora de la enfermedad mediada por la vacuna, en términos de patología pulmonar, en comparación con una vacuna basada en el virus inactivado con formalina. Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que ya una única vacunación con la secuencia de ARNm inventivo era suficiente para producir una respuesta inmunitaria contra los antígenos administrados. Específicamente, se ha encontrado que una administración única, preferentemente por inyección intradérmica o intramuscular, del ARNm inventivo es muy eficiente reduciendo los títulos virales en el pulmón después de la inoculación con el virus RSV.

En resumen, la secuencia de ARNm de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas podría proporcionar una vacuna efectiva y segura, en particular para lactantes, ancianos y pacientes inmunodeprimidos.

También se describe aquí una secuencia de ARNm que comprende una región codificante, que codifica para al menos un péptido o proteína antigénico derivado de la proteína de fusión F, de la glucoproteína G, de la proteína hidrofóbica corta SH, de la proteína matriz M, de la nucleoproteína N, de la polimerasa Long L, de la proteína M2-1, de la proteína M2-2, de la fosfoproteína P, de la proteína NS1 no estructural o de la proteína NS2 no estructural del virus respiratorio sincitial (RSV) o un fragmento, variante o derivado de la misma.

La región codificante de la secuencia de ARNm de acuerdo con el primer aspecto de la presente descripción se puede estar presente como un ARNm mono-, bi- o incluso multi-cistrónico, es decir, una secuencia de ARNm que porta las secuencias codificantes de una, dos o más proteínas o péptidos. Estas secuencias codificantes de los ARNm bi- o multi-cistrónicos pueden estar separadas por al menos una secuencia de sitio de entrada ribosomal interna (IRES), por ejemplo como se describe aquí, o por péptidos de señal que inducen la segmentación del polipéptido resultante que comprende diversas proteínas o péptidos.

De acuerdo con el primer aspecto de la presente descripción, la secuencia de ARNm comprende una región codificante que codifica para al menos un péptido o proteína antigénico derivado de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa Long L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural del virus respiratorio sincitial (RSV), o de un fragmento, variante o derivado de los mismos. En una realización aquí descrita, la secuencia de ARNm comprende una región codificante que codifica para al menos un péptido o proteína antigénico derivado de la proteína de fusión F, la nucleoproteína N o la proteína M2-1 del virus respiratorio sincitial (RSV) o un fragmento, variante o derivado de los mismos.

En este contexto, la secuencia de aminoácidos del al menos un péptido o proteína antigénico se puede seleccionar de cualquier péptido o proteína derivado de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa Long L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural de cualquier aislado del RSV o de cualquier péptido proteína de RSV diseñados sintéticamente por ingeniería o a partir de un fragmento, variante o derivado de los mismos.

En una realización no reivindicada, la proteína de longitud total de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta de SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa Long L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural del virus respiratorio sincitial (RSV) es codificada por la región codificante comprendida en el ARNm inventivo.

En esta realización no reivindicada, la proteína de longitud total de la proteína de fusión F y la nucleoproteína N son particularmente preferentes. Además, es particularmente preferente un mutante de proteína F con una delección de la cola citoplasmática. Un ejemplo de este mutante de delección es la proteína larga RSV-F 554-574 de acuerdo con Oomens *et al.*, 2006, J. Virol. 80(21):10465-77.

En otra realización aquí descrita, un fragmento que comprende al menos un epítipo de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta de SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa grande L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural del virus respiratorio sincitial (RSV) es codificado por la región codificante comprendida en el ARNm.

Se describen aquí las secuencias de aminoácidos de la cepa long del RSV (ATCC VR-26) de acuerdo con el No. de acceso NCBI AY911.262:

Proteína de fusión F de la cepa de RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 1

MELPILKANA ITTILAAVTF CFASSQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
LSNIKENKCN GTDAKVKLIN QELDKYKNAV TELQLLMQST TAANNRRARRE LPRFMNYTLN
NTKKTNTVLS KKRKRRLGFL LGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVINKQ SCRISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
LVFSPDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHHVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS
LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN

Glucoproteína G de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

- 5 **Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 2**

MSKNKDQRTA KTEKTWDTL NHLLFISSGL YKLNLSIAQ ITLSILAMII STSLIITAI
FIASANKHVT LTTAIQDAT SIKNTTPTY LTQDPQLGIS FSNLSEITSQ TTILASTTP
GVKSNLQPTT VKTKNTTTTQ TQPSKPTTKQ RQNKPPNKPND FHFVEVNF VPCSICSNP
TCWAICKRIP NKKPGKTTT KPTKPTFKT TKKDLKPQTT KPKEVPTTKP TEEPTINTTK
TNITTTLLTN NTTGNPKLTS QMETFHSTSS EGNLSPSQVS TTSEHPSQPS SPPNTRQ

Proteína hidrofóbica corta SH de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 3

MENTSITIEF SSKFWPYFTL IHMITTIISL LIIISIMTAI LNKLCYNVF HNKTFELPRA
RVNT

- 10 **Proteína matriz M de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:**

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 4

METYVNKLHE GSTYTAQVY NVLEKDDDA SLTIWVPMFQ SSMPADLLIK ELANVNILVK
QISTPKGPSL RVMINRSAL LAQMPSKFTI CANVSLDERS KLAYDVTTTPC EIKACSLTCL
KSKNMLTTVK DLTMKTLNPT HDIIALCEFE NIVTSKKVII PTYLRISVR NKDLNTLENI
TTTEFKNAIT NAKIIPYSGL LLVITVTDNK GAFKYIKPQS QFIVDLGAYL EKESIYYVT
NWKHTATRFA IKPMED

Nucleoproteína N de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 5

MALSKVKLND TLNKDQLLS SKYTIQRSTG DSIDTPNYDV QKHINKLCGM LLITEDANHK
FTGLIGMLYA MSRLGREDTI KILRDAGYHV KANGVDVTTH RQDINGKEMK FEVLTLASLT
TEIQINIEIE SRKSYKKMLK EMGEVAPEYR HDSPDCGMII LCIAALVITK LAAGDRSGLT
AVIRRANNVL KNEMKRYKGL LPKDIANSFY EVFEKHPHFI DVFVHFGIAQ SSTRGGSRVE
GIFAGLFMNA YGAGQVMLRW GVLAKSVKNI MLGHASVQAE MEQVVEVY EY AQKLGEAGF
YHILNNPKAS LLSLTQFPHF SSVVLGNAAG LGIMGEYRGT PRNQDLYDAA KAYAEQLKEN
GVINYSVLDL TAELEAIAKH QLNPKDNDVE L

- 15

Polimerasa larga L de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 6

MDPIINGNSA NVYLTDSYLK GVISFSECNA LGSYIFNGPY LKNDYTNLIS RQNPLIEHMN
LKKLNITQSL ISKYHKGEIK LEEPTYFQSL LMTYKSMTSL EQIATTNLLK KIIRRAIEIS
DVKVYAILNK LGLKEKDKIK SNNGQDEDNS VITTIKDDI LSAVKDNQSH LKADKNHSTK
QKDTIKTTLL KKLMSMQHP PSWLIHWFNL YTKLNNILTQ YRSNEVKNHG FILIDNQTLS

GFQFILNQYG CIVYHKELKR ITVTTYNQFL TWKDISLSRL NVCLITWISN CLNTLNKSLG
 LRCGFNNVIL TQLFLYGDCI LKLFHNEGFI IIEVEGFIM SLILNITEED QFRKRFYNSM
 LNNITDAANK AQKNLLSRVC HTLLDKTVSD NIINGRWIIL LSKFLKLIKL AGDNNLNLS
 ELYFLFRIFG HPMVDERQAM DAVKVCNET KFYLLSSLSM LRGAIFYRII KGFVNNYNRW
 PTLRNAIVLP LRWLTYKLN TYPSSLELTE RDLIVLSGLR FYREFRLPKK VDLEMIINDK
 AISPPKNLIW TSFPRNYMPS HIQNYIEHEK LKFSESDKSR RVLEYLRLDN KFNECDLYNC
 VVNQSYLNNP NHVVSILTGE RELSVGRMFA MQPGMFRQVQ ILAEKMIAEN ILQFFPESLT
 RYGDLELQKI LELKAGISNK SNRYNDNYNN YISKCSIITD LSKFNQAFRY ETSCICSDVL
 DELHGVQSLF SWLHLTIPHV TIICTYRHAP PYIRDHIVDL NNVDEQSGLY RYHMGGIEGW
 CQKLWTIEAI SLLDLISLKG KFSITALING DNQSIDISKP VRLMEGQTHA QADYLLALNS
 LKLLYKEYAG IGHKLKGTET YISRDMQFMS KTIQHNGVYY PASIKKVLRV GPWINTILDD
 FKVSLESIGS LTQEEYRGE SLLCSLIFRN VWLYNQIALQ LKNHALCENN LYLDILKVLK
 HLKTFNLDN IDTALTLYMN LPMFLGGGDP NLLYRSFYRR TPDFLTEAIV HSFVILSYIT
 NHDLKDKLQD LSDDLRLNKL TCIITFDKNP NAEFVTLMRD PQALGSRQA KITSEINRLA
 VTEVLSTAPN KIFSKSAQHY TTTEIDLNDI MQNIEPTYPH GLRVVYESLP FYKAEKIVNL
 ISGTSITNI LEKTSIDLTD DIDRATEMMR KNITLLIRIL PLDCNRDKRE ILSMENLSIT
 ELSKYVRERS WLSNIVGVV SPSIMYMDI KYTTSTIASG IIEKYNVNS LTRGERGPTK
 PWVGSSTQEK KTMPVYNRQV LTKKQRDQID LLAKLDWVYA SIDNKDEFME ELSIGTLGLT
 YEKAKKLPFQ YLSVNYLHRL TVSSRPCEFP ASIPAYRTTN YHFDTSPINR ILTEKYGDED
 IDIVFQNCIS FGLSLMSVVE QFTNVCPNRI ILIPKLNEIH LMKPPIFTGD VDIHKLKQVI
 QKQHMFLPKD ISLTQYVELF LSNKTLKSGS HVNSNLILAH KISDYFHNTY ILSTNLAGHW
 ILIIQLMKDS KGIFEKDWGE GYITDHMFIN LKVFFNAYKT YLLCFHKGYG KAKLECDMNT
 SDLLCVLELI DSSYWKSMK VFLEQKVIKY ILSQDASLHR VKGCHSFKLW FLKRLNVAEF
 TVCPWVVID YHPTMKAIL TYIDLVRMGL INIDRIHIKN KHKFNDEFYT SNLFYINYNF
 SDNTHLLTKH IRIANSELEN NYNKLHPTP ETLENILANP IKSNDKKTIN DYCIGKNVDS
 IMLPLLSNKK LVKSSAMIRT NYSKQDLYNL FPTVVIDRII DHSGNTAKSN QLYTTTSHQI
 SLVHNSTSLY CMLPWHHINR FNFVFSSTGC KISIEYILKD LKIKDPNCIA FIGEGAGNLL
 LRTVVELHPD IRYIYRSLKD CNDHSLPIEF LRLYNHINI DYGENLTIPA TDATNNIHS
 YLHIKFAEPI SLFVCDAELP VTNWNSKIII EWSKHVRKCK YCSSVNKCTL IVKYHAQDDI
 DFKLDNITIL KTYVCLGSKL KGSEVYLVLT IGPANIFPVF NVVQNAKLIL SRTKNFIMPK
 KADKESIDAN IKSLIPFLCY PITKKGINTA LSKLKSUVSG DILSYSIAGR NEVFSNKLIN
 HKHMNLIKWF NHVLNFRSTE LNYNHLYMVE STYPYLSSELL NSLTTELK LKIKITGSLY
 NFHNE

Proteína M2-1 de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 7

MSRRNPCKFE IRGHCLNGKR CHFSHNYFEW PPHALLVRQN FMLNRILKSM DKSIDTLSEI
 SGAAELDRTE EYALGVGVVL ESYIGSINNI TKQSACVAMS KLLTELNSDD IKKLRDNEEL
 NSPKIRVYNT VISYIESNRK NNKQTIHLLK RLPADVLKKT IKNTLDIHK IKTNNPKELT
 VSDTNDHAKN NDTT

5

Proteína M2-2 de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 8

MTMPKIMILP DKYPCSITSI LITSRCRVTM YNRKNTLYFN QNNPNNHMYS PNQTFNEIHW
 TSQDLIDTIQ NFLQHLGVIE DIYTIYILVS

Fosfoproteína P de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 9

10

MEKFAPEFHG EDANNRATKF LESIKGKFTS PKDPKKKDSI ISVNSIDIEV TKESPITSNS
 TIINPTNETD DNAGNKPNYQ RKPLVSFKED PIPSDNPFSK LYKETIETFD NNEEESSYSY
 EEINDQTNDN ITARLDRIDE KLSEILGMLH TLVVASAGPT SARDGIRDAM VGLREEMIEK
 IRTEALMTND RLEAMARLRN ESEKMAKDT SDEVSLNPTS EKLNNLLEGN DSDNDLSLED
 F

Proteína no estructural NS1 de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 10

MGSNSLSMIK VRLQNLFND EALLKITCY TDKLIHLTNA LAKAVIHTIK LNGIVFVHVI
 TSSDICPNNN IVVKSNTTM PVLQNGGYIW EMMELTHCSQ PNGLIIDNCE IKFSKKLSDS
 TMTNYMNQLS ELLGFDLNP

5

Proteína no estructural NS2 de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 11

MDTTHNDTTP QRLMITDMRP LSLETTITSL TRDIITHRFI YLINHECIVR KLDERQATFT
 FLVNYEMKLL HKVGSTKYKK YTEYNKYGT FPMPIFINHD GFLECIGIKP TKHTPIIYKY
 DLNP

- 10 En el contexto de la presente descripción, además de las secuencias de aminoácidos aquí descritas según las SEQ ID NO: 1-11, también se pueden utilizar secuencias de aminoácidos de diferentes aislados del virus respiratorio sincitial (RSV). Estos aislados del virus respiratorio sincitial (RSV) preferentemente tiene una identidad de al menos un 70%, con mayor preferencia de al menos un 80% y con total preferencia de al menos un 90% con las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID Nos: 1-11.
- 15 Además, en este contexto, la región codificante que codifica para al menos un péptido o proteína antigénico derivado de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa large L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína no estructural NS2 del virus respiratorio sincitial (RSV) o para un fragmento, variante o derivado de los mismos se puede seleccionar de cualquier secuencia de ácido nucleico que comprenda una región codificante derivada de cualquier aislado del virus respiratorio sincitial (RSV) o de un fragmento o variante del mismo.
- 20

SE describen aquí secuencias de ARNm de tipo salvaje de las regiones codificantes de la cepa long de RSV (ATCC VR-26) de acuerdo con el No. de acceso NCBI AY911262:

ARNm que codifica para la proteína de fusión F de la cepa de RSV ATCC VR-26 long:

- 25 **Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 12:**

auggaguugccaaucccuaaagcaaaugcaauuaccacaauccucgcugcagucacauuuugcuuugcuuaguca
 aaacaucacugaagaauuuuaucaaucaacaugcagucaguuagcaaaagcuaucuuagugcucuaagaacugguu
 gguauacuaguguuauaacuauagaauuaaguaaucaaggaaaauaaguguaauggaacagauugcuaagguaaaa
 uugauaaaaccaagaauuagauaaaauaaaaaagcuguaacagaauugcaguuugcuaugcaaaagcacaacagcagc
 aaacaaucgagccagaagagaacuaccaagguuuuagaaauuacacucaacaauacaaaaaaaccaauguaacauu
 aagcaagaaaaggaaaagaagauuuuugguuuuuuuguuagguugugauucugcaauugccaguggcauugcuguau
 cuaagguccugcacuuagaaggagaagugaacaagaucaaaagugcucuaucuauccacaaaagggccguagucagcu
 uaucaaauggaguuagugucuuuaccagcaaauguuuagaccucaaaaacuauuagauaaaacauuuguuaccuauu
 gugaaauagcaaaagcugcagaauucaaauuagaaacugugauagaguuccaacaagaacaacagacuacuagag
 auuaccagggaauuuaguguuuagcagguguaacuacaccuguaagcacuuacauguuuacuaauuagugaaauu
 ugucauuaucaaugauaugccuaaacaauuagaucaaaaaaguuuauuguccaacaauuucuaauuaguuagacag
 caaaguuacucuaucauguccauaauaaaagggaagucuuagcauuguaagucacauuaccacuaauuggugugau
 agauacaccuuguuuggaaaauacacaucccccuauguaacaaccaacacaaaagaagggucaaacaucuguuuua
 caagaacugacagaggauugguacugugacaauugcaggauagauucuuuucccacaagcugaaacauguaaauguu
 caaucgaucgaguuuuuugugacacaaugaacaguuuacauuaccaagugaaguuuacucugcaauugugacau
 auucaauucccaauuagauuguaaaauuagacuucaaaaacagauuaagcagcuccguuaucaucucuaaggag
 ccauugugucaugcuauggcaaaacuaaauguacagcauccaauaaaaucguggaaucuaaaagacauuuuuaac
 gggugugauuuuaguucaaaauaaaggggugagacugugucuguaagguaacacauuauuuuaguuauaaagcaaga
 aggcaaaagucucuauguaaaaggugaaccaauaauaaauuucuaugaccauuaguuuucccucugauuauuug
 augcaucaauuucuaagucaauagagaagauuaccagaguuuagcauuuauucguaaauccgaugaaauuauaca
 cauguaaaugcugguaaaaucaaccacaaauuaucaugauaacuacuaauuauuagugauuauaguuauuuguuau
 cauuauuugcuguuggacugcuccuauacuguaaggccagaagcacaccagucacacuaagcaaggaucaacugagu
 gguauaaaauauuugcauuuaguaacuga

ARNm que codifica para la glucoproteína G de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 13:

auguccaaaaaaggaccaacgcaccgcuagacacuaagaaaagaccugggacacucucauauuuuuuuuaua
 ucaucgggcuuauuauaguuuuuauuauuagcacaauuacauuuccauuucggcaaugauuauuaucaac
 uuacuuuauuuuacagccaucauuuauuagccucggcaaaccaaaagucacacuaacaacugcauauacaag
 augcaacaagccagaucaagaacacacaccccaacauaccucacucaggauccucagcuuggaaucagcuucaccauc
 ugucugaaauuacaucaaaaccaccacauuagcuuacaacacaccaggagucagucacaaaccugcaaccacaa
 cagucaagacuaaaaaacacaacaacaccccaacacacccagcaagccacuaaaaaaacgcaaaaacaaaccacc
 aaacaaaccccauuuaguuuuuacuuucgaaguuuuuacuuuuguaaccugcagcauauugcagcaacaauccaaccu
 gcugggcuauucgcaaaagaauaccaacaaaaaacaggaaagaaaaccaccaccaagccuacaaaaaaccaaccu
 ucaagacaaccaaaaaagauucaaaaccucaaaccacuaaaacaaaggaaguaccaccaccaagcccacagaagagcc
 aaccauacacaccacaaaaacaaacaucaacuacacugcucaccaacaacaccacaggaaauccaaaacucacaag
 ucaaauggaaaccuuccacuaaccuccuccgaaggcauucuaagccuucuaagucuccacaacaucaggagacccc
 aucacaaccucuaucuccaccaacacacacgcccaguuag

ARNm que codifica para la proteína hidrofóbica corta SH de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 14:

auggaaaauacauccaauagaauucuaagcaauucuggccuacuuuacacuaauacacaugacacac
aaauaucucuuugcuaucauauucuccaucaugacugcauacuaaacaacuuugugaauuaacguauuccau
aacaaaaccuuugaguuaaccaagagcugcagugaacacauag

ARNm que codifica para la proteína de matriz M de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

5 Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO: 15:

auggaaacauacgugaacaagcuucacgaaggcuccacauacacagcugcuguuacaauguccuagaaaaagac
gaugaccugcaucacuuacaaauaggugcccauguuacaaucuaugccagcagauuuacuuauaaaagaacu
agcuauugucaacauacuagugaaacaaauuccacacccaagggaaccuacuaagagucagauaaacucaagaag
ugcauugcuagcacaauaggccagcaauuuuaccuauugugcuauuguguccuuggaugaaagaagcaaacuggcau
augauguaaccacaccugugaaaucaaggcauguagucuaacaugccuaaaaucaaaaauauguuacucaguu
aaagaucucacuaugaagacacuaacccacacaugauuuuugcuuuuugugaaauugaaaacauaguaacauc
aaaaaaagucuaauaccaacauaccuaagauccaucagugucagaaaauaagaucugaacacacuugaaaauaac
aaccacugaaaucaaaaugccaucacaaugcaaaaucacccuacucaggaauacuaauagucacacaguga
cugacaacaaaggagcauucaaauacuaaaagccgcaaagucuucauaguagauucuggagcuuaccuagaaaaag
aaaguauauuuuuguuaccacaaauuggaagcacacgcuacacgauuuugcaucaaaccuaggaagauuaa

ARNm que codifica para la nucleoproteína N de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 16:

auggcucuugcaaaagucaaguugaauacacucaacaaagaucaacuucugucaucuaagcaauacaccaucca
acggagcacaggagauaguauugauacuccuauuuuagauugcagaaacacaucaauaaguuuugggcaguuuu
uaucacagaagagucuaaucauaaaucacuggguuaauagguauguuauugcuauugcuagguuaggaagagaa
gacaccauaaaaauacucagagauugcgggaaucauguaaaagcaauaggagauagauaacaacacaucgucaagac
aucauugggaaagaaugaaauuugaaguuuacauuggcaagcuuaacaacugaaaucaaaucacauugagau
agaaucuagaaauccuacaaaaaagcuaaaaagaaugggagagguagcuccagaauacaggcaugauuuccuga
uuuguggagauaauuuuaguuagcagcauuaguuuaccaaauuggcagcaggggaugauucuggucuuacag
ccgugauuaggagagcuauaauguccuaaaaaaugaaugaaacguuacaaaggcuuacuaccaaggauuagcc
aacagcuucuaugaaguuuugaaaaacauccccacuuuauagauuuuuuguucauuuugguauagcacaauuu
ccaccagagguggcaguuaguuuagagggaauuuuugcaggaauuuuauagaauccuauuggugcagggcaaguuu
cuacgguggggagucuuagcaaaucaguuuuuuuuuuuaguuuaggaucagcuagugugcaagcagaauggaaca
aguuuuugagguuuuagaaauugccaaaaauuggguggagaagcaggaauucacauauuuugaacaacccaaaag
cauauuuuuuacuuugacuaauuuccucacuuuuccaguguaguauuaggcauugcugcuggccuaggcauuu
gggagagucagagguaacccgaggaaucaagaucauauagauugcagcaaggcauugcugaacaacucuaagaaa
uggugugauuuacucaguuuagacuuagacagcagaagaacuagaggcuaucaaaacacagcuuaauccaaaag
auaauagauagagcuuuga

10 **ARNm que codifica para la polimerasa long L de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:**

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 17:

[illegible]

[illegible]

ARNm que codifica para la proteína M2-1 de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 18:

Augucacgaagggaauccuugcaaaauugaaaucgagggucauugcuugaaugguaagagaugucauuuuagucaua
auuuuuuugaauggccaccccaugcacugcucguaagacaaaacuuuauuguuaaacagaauacuuuagucuauggau
aaaaguauagauaccuuaucagaaaauaugggagcugcagaguuggacagaacagaaggaauugcucuugguguagu
uggagugcuagagaguuauauagggaucaaauaaauauaauacuaaacaaucagcauguguuugccaugagcaaacucc
ucacugaacucaauagugaugauaucaaaaaacugagagacaaugaagagcuaaaauaccccaagauaagaguguaca
auacugucauaucauauauugaaagcaacaggaaaaacaauaaacaaacuauccaucuguuaaaaagauuugccagca
gacguauuugaagaaaaccaucaaaaaacauuuggauauccacaagagcauaaccaucaacaaccccaaagaaauuacu
guuagugauacaaaugaccaugccaaaaauaauagauacuaccuga

ARNm que codifica para la proteína M2-2 de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 19:

augaccaugccaaaaaauaugauacuaccugacaaaauuccuuguaguauaacuuccauacuaauaacaaguagaug
uagagucacuauguauaaucgaaagaacacacuaauuuucaaucaaaacaacccaaaauaaccauauguacucaccga
aucaaaacauucaaugaaauccauuggaccucacaagacuugauugacacaaaucaaaauuuucuaagcaucuaaggu
guuuuugaggauauauauacaauauauauuuuagugucauaa

- 5 ARNm que codifica para la fosfoproteína P de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO: 20:

auggaaaaguuugcuccugaaauccaugggagaagauGCCaaacacaggggcuacuaaaauccuagaaucaaauaaaggg
 caaaauccacauaccuuaaagaucccaagaaaaaagauagauacuaucugucacuaaagauauagaaguaacca
 aagaaagcccuauaacaucaaaaucaaccauuaauaaccacaagaugagacagauaauugcaggggaaacaagccca
 auuaucaaagaaaaccucuaaguaaguuucaaagaagaccuauaccaagugauaaucccuuuucaaacuauacaaa
 gaaaccuagagacauuuguaaacaauagaagaagaucuaagcuauuacuaugaagaaauaaaugaucagacgaacga
 uaaauaaacugcaagauuagauaggauuugaugaaaauuaagugaauacuaggaaugcuucacacauuaguuag
 caaugcaggaccuacaucugcuagggaugguauaagagauGCCauggguugguuuaagagaagaaauagauagaaaaa
 aucagaacugaagcauuuaugaccaaugacagauuagaagcuauggcaagacucagggaugaggaaagugaaaaagau
 gcaaaagacacaucagaugaagugucucucuaauccaacaucagagaaaauugaacaaccguuugggaagggaugauagu
 gacaaugaucuaucacuugaagauuuucuga

ARNm que codifica para la proteína NS1 no estructural de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 21:

auggggcagcagaauucgubugaguaugauaaaagubagauuacaaaubugubugacaaugaugaaugagcaubugubaaa
 aaauaacaugcuauacugacaaaubaaucabuuuacuaaauugcuubuggcuuaaggcagugauacauacaaucaaaubga
 auggcgaubugububugugcaugubauuacaaugugauauubugcccaauaauaauaauubuguaaaaauccaauuu
 cacaacaaugccagugcuacaaauggaggubuaubauugggaaaugaugggaauuaacacauugcucucaaccuaaugg
 gucuaauagaugacaaubugugaaaubaaauucuccaaaaacuaagugauucaacaugaccaauubaugaaucaa
 ubaucugaauuacuuggauubugaucuuaauccauaa

- 10

ARNm que codifica para la proteína NS2 no estructural de la cepa del RSV ATCC VR-26 long:

Secuencia de ARNm de acuerdo con la SEQ ID NO 22:

auggacacaaccacaaugauaccacaccacaaagacugaugacacagacaugagaccguugucacuugagacuaca
 auaacauacuaaccagagacaucauaacacacagauuuauuacuuauaaaucaugaauugcauagugagaaaacu
 ugaugaaagacaggccacauuuacauuccuggucaacuugaaaugaaacuauugcacaaguaggaagcacuaaa
 auaaaaaauuacugaauacaacacaaaauugggcacuuuccuauugccgauuuucaucaaaucaugauggguucua
 gaauugcauuggcauuuagccuacaaagcauacuccauuuauacaaguaugaucucaauccauag

En el contexto de la presente descripción, además de las secuencias de ácido nucleico aquí descritas, también se incorporan aquí secuencias de ácido nucleico de diferentes aislados del virus respiratorio sincitial (RSV). Estos diferentes aislados del virus respiratorio sincitial (RSV) preferentemente tienen una
 5 identidad de al menos un 50%, 60%, 70%, con mayor preferencia de al menos un 80% y con total preferencia de al menos un 90% con las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con las SEQ ID Nos: 12-22 o fragmentos de las mismas.

En una realización preferente, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no comprende un gen
 10 reporter ni un gen marcador. Preferentemente, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no codifica, por ejemplo, para la luciferasa, la proteína fluorescente verde (GFP) y sus variantes (tales como eGFP, RFP o BFP), la α -globina, la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT), la β -galactosidasa; la galactokinasa, la fosfatasa alcalina, la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP)) o para un gen de resistencia (tal como un gen de resistencia a neomicina, puromicina, higromicina y zeocina). En una realización preferente, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no codifica
 15 para luciferasa. En otra realización, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no codifica para GFP o para una variante de la misma.

En otra realización preferente, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no codifica para una
 20 proteína (o para un fragmento de una proteína) derivada de un virus que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. De preferencia, la secuencia de ARNm no codifica una proteína que se deriva de un virus de la influenza, con mayor preferencia de un virus de la influenza A. Preferentemente, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no codifica una proteína de la influenza A seleccionada del grupo consistente en hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), M1, M2, NS1, NS2 (NEP: proteína de exportación nuclear), PA, PB1 (polimerasa básica 1), PB1-F2 y PB2. En otra realización preferente, el ARNm de acuerdo con la invención no codifica para ovoalbúmina (OVA) o para un fragmento
 25 de la misma. De preferencia, la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención no codifica para una proteína de la influenza A u ovoalbúmina.

En una realización adicional, el ARNm inventivo preferentemente comprende al menos uno de los siguientes
 30 elementos estructurales: un elemento de la región no traducida (elemento UTR) 5' y/o 3', en particular un elemento 5'-UTR que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'-UTR de un gen TOP o de un fragmento, homólogo o variante del mismo, o un elemento 5' y/o 3'-UTR que se puede derivar de un gen que proporciona un ARNm estable o proveniente de un homólogo, fragmento o variante del mismo; una estructura tallo-bucle de histona, de preferencia un tallo-bucle de histona en su región no traducida 3'; una estructura 5'-CAP; una cola poli-A; o una secuencia poli(C).

En una realización preferente del primer aspecto de la presente invención, el ARNm inventivo comprende
 35 al menos un elemento 5'- o 3'-UTR. En este contexto, un elemento UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'- o 3'-UTR de cualquier gen de origen natural o que se deriva de un fragmento, homólogo o variante de la 5'- o 3'-UTR de un gen. Preferentemente, el elemento 5'- o 3'-UTR utilizado de acuerdo con la presente invención es heterólogo a la región codificante de la secuencia de ARNm inventiva. Incluso si se prefieren los elementos 5'- o 3'-UTR derivados de genes de
 40 origen natural, también se pueden utilizar en el contexto de la presente invención elementos UTR sintéticos diseñados por ingeniería.

En una realización particularmente preferente del primer aspecto de la presente invención, la secuencia de
 45 ARNm inventiva comprende al menos un elemento de la región no traducida 5' (elemento 5'UTR) que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP o que se deriva de un fragmento, homólogo o variante de la 5'UTR de un gen TOP.

Es particularmente preferente que el elemento 5'UTR no comprenda un motivo TOP ni un 5'TOP como se han definido anteriormente.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del elemento 5'UTR que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP termina en su extremo 3' con un nucleótido ubicado en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o

10 aguas arriba del codón de inicio (por ejemplo A(UT)G) del gen o del ARNm del que se deriva. Así, el elemento 5'UTR no comprende ninguna parte de la proteína que codifica para la región. De esta forma, preferentemente, la única parte codificante de la proteína del ARNm inventivo es proporcionada por la región codificante.

- 5 La secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP se deriva de un gen TOP eucariota, preferentemente de un gen TOP vegetal o animal, con mayor preferencia de un gen TOP de cordado, incluso con mayor preferencia de un gen TOP de vertebrado, con total preferencia de un gen TOP de mamífero, tal como de un gen TOP de humano.

- 10 Por ejemplo, el elemento 5'UTR preferentemente se selecciona de los elementos 5'-UTR que comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, a partir de homólogos de las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una variante de los mismos o, de preferencia, de una secuencia de ARN correspondiente. El término
- 15 "homólogos de las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700" se refiere a secuencias de otras especies distintas a *Homo sapiens* que son homólogas a las secuencias de acuerdo con las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700.

- 20 En una realización preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico que se extiende desde la posición de nucleótido 5 (es decir, el nucleótido en la posición 5 en la secuencia) hasta la posición de nucleótido inmediatamente 5' al codón de inicio (en el extremo 3' de las secuencias), por ejemplo la posición de nucleótido inmediatamente 5' a la secuencia ATG, de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de los
- 25 homólogos de las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una variante de los mismos, o de una secuencia de ARN correspondiente. Es particularmente preferente que el elemento 5'UTR se derive de una secuencia de ácido nucleico que se extiende desde la posición de nucleótido inmediatamente 3' a la 5'TOP hasta la posición de nucleótido inmediatamente 5' al codón de inicio (en el extremo 3' de la secuencia), por ejemplo la posición
- 30 de nucleótido inmediatamente 5' a la secuencia ATG de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de los homólogos de las SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 y SEQ ID NO: 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una variante de los mismos, o de una secuencia de ARN correspondiente.

- 35 En una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosómica o de una variante de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosómica. Por ejemplo, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 67, 170, 193, 244, 259, 554,
- 40 650, 675, 700, 721, 913, 1016, 1063, 1120, 1138 y 1284-1360 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una secuencia de ARN correspondiente, de un homólogo de la misma de o una variante de la misma como se describe aquí, preferentemente sin el motivo 5'TOP. Como se describió anteriormente, la secuencia que se extiende desde la posición 5 hasta el nucleótido inmediatamente 5' al ATG (que se ubica en el extremo 3' de las secuencias) corresponde a la 5'UTR de dichas secuencias.

- 45 Preferentemente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosómica Large (RPL) o de un homólogo o variante de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosómica Large (RPL). Por ejemplo, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 67, 259,
- 50 1284-1318, 1344, 1346, 1348-1354, 1357, 1358, 1421 y 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, una secuencia de ARN correspondiente, un homólogo de la misma, o una variante de la misma como se describe aquí, que preferentemente carece del motivo 5'TOP.

- 55 En una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen Large 32 de una proteína ribosómica, preferentemente de un gen Large 32 (L32) de una proteína ribosómica de vertebrado, con mayor preferencia de un gen Large 32 (L32) de una proteína ribosómica de mamífero, con mayor preferencia de un gen Large 32 (L32) de una proteína ribosómica humana, o a partir de una variante de la 5'UTR de un gen Large 32 de una proteína ribosómica, de preferencia a partir de un gen Large 32 (L32) de una proteína ribosómica de

vertebrado, con mayor preferencia a partir de un gen Large 32 (L32) de una proteína ribosómica de mamífero, con mayor preferencia a partir de un gen Large 32 (L32) de una proteína ribosómica humana, donde preferentemente el elemento 5'UTR no comprende el 5'TOP de dicho gen.

- Por consiguiente, en una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 40%, de preferencia de al menos aproximadamente un 50%, de preferencia de al menos aproximadamente un 60%, de preferencia de al menos aproximadamente un 70%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 80%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 90%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 95%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 23 (5'-UTR de la proteína Large 32 ribosómica humana sin el tracto de oligopirimidina 5' terminal: GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCGGCATC; correspondiente a la SEQ ID NO: 1368 de la solicitud de patente W02013/143700) o, de preferencia, con una secuencia de ARN correspondiente, o donde al menos un elemento 5'UTR comprende o consiste en un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que tenga una identidad de al menos aproximadamente un 40%, de preferencia de al menos aproximadamente un 50%, de preferencia de al menos aproximadamente un 60%, de preferencia de al menos aproximadamente un 70%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 80%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 90%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 95%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 23 o, con total preferencia, con una secuencia de ARN correspondiente, donde, preferentemente, el fragmento es como se describió anteriormente, es decir un tramo continuo de nucleótidos que representa al menos un 20%, de preferencia al menos aproximadamente un 30%, con mayor preferencia al menos aproximadamente un 40%, con mayor preferencia al menos aproximadamente un 50%, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente un 60%, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente un 70%, incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente un 80% y con total preferencia al menos aproximadamente un 90% de la 5'UTR de longitud total. Preferentemente, el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más, en especial al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más, con mayor preferencia al menos aproximadamente 40 nucleótidos o más. Preferentemente, el fragmento es un fragmento funcional como se describe aquí.

- En algunas realizaciones, el ARNm inventivo comprende un elemento 5'UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP de vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo un gen TOP humano seleccionado de RPSA, RPS2, RPS3, RPS3A, RPS4, RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS10, RPS11, RPS12, RPS13, RPS14, RPS15, RPS15A, RPS16, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27, RPS27A, RPS28, RPS29, RPS30, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL8, RPL9, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL21, RPL22, RPL23, RPL23A, RPL24, RPL26, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL32, RPL34, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL38, RPL39, RPL40, RPL41, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPLP3, RPLP0, RPLP1, RPLP2, EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G, EEF2, EIF3E, EIF3F, EIF3H, EIF2S3, EIF3C, EIF3K, EIF3EIP, EIF4A2, PABPC1, HNRNPA1, TPT1, TUBB1, UBA52, NPM1, ATP5G2, GNB2L1, NME2, UQCRB, o de un homólogo o variante de los mismos, donde preferentemente el elemento 5'UTR no comprende un motivo TOP o la 5'TOP de dichos genes y donde opcionalmente el elemento 5'UTR comienza en su extremo 5' con un nucleótido ubicado en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aguas abajo del tracto de oligopirimidina 5' terminal (TOP) y donde opcionalmente además el elemento 5'UTR, que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP termina en su extremo 3' con un nucleótido ubicado en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aguas arriba del codón de inicio (A(U/T)G) del gen del cual se deriva.

- En otra realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la de la 5'-UTR de un gen de proteína ribosómica LARGE 32 (RPL32), un gen de proteína ribosómica LARGE 35 (RPL35), un gen de proteína ribosómica LARGE 21 (RPL21), una ATP sintasa, un transportador H⁺, un complejo F1 mitocondrial, una subunidad alfa 1, gen de músculo cardíaco (ATP5A1), gen hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4), un gen 1 inducido por andrógenos (AIG1), un gen Vic de la subunidad citocromo c oxidasa (COX6C) o un gen N-acilesfingosina amidohidrolasa (ceramidasa ácida) 1 (ASA1) o de una variante de los mismos, preferiblemente de un gen de proteína ribosómica LARGE 32 (RPL32) de vertebrado, un gen de proteína ribosómica LARGE 35 (RPL35) de vertebrado, un gen de proteína ribosómica LARGE 21 (RPL21) de vertebrado, una ATP sintasa de vertebrado, un transportador H⁺, un complejo F1 mitocondrial, una subunidad alfa 1, un gen de músculo cardíaco (ATP5A1), un gen hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4) de vertebrado, un gen 1 inducido por andrógenos (AIG1) de vertebrado, un gen Vic de la subunidad citocromo c oxidasa (COX6C) de vertebrado o un gen N-acilesfingosina amidohidrolasa (ceramidasa ácida) 1 (ASA1) de vertebrado, o de una variante de los mismos; más preferiblemente de un gen proteína ribosómica LARGE 32 (RPL32) de

mamífero, un gen de proteína ribosómica LARGE 35 (RPL35) de mamífero, un gen de proteína ribosómica LARGE 21 (RPL21) de mamífero, una ATP sintasa de mamífero, un transportador H⁺, un complejo F1 mitocondrial, una subunidad alfa 1, gen de músculo cardíaco (ATP5A1), un gen hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4) de mamífero, un gen 1 inducido por andrógenos (AIG1) de mamífero, un gen

5 Vic de la subunidad citocromo c oxidasa (COX6C) de mamífero, un gen N-acilesfingosina amidohidrolasa (ceramidasa ácida) 1 (ASA1) de mamífero o de una variante de los mismos; con total preferencia de preferiblemente de un gen de proteína ribosómica LARGE 32 (RPL32) de vertebrado, un gen de proteína ribosómica LARGE 35 (RPL35) humana, un gen de proteína ribosómica LARGE 21 (RPL21) humana, una

10 ATP sintasa humana, un transportador H⁺, un complejo F1 mitocondrial, una subunidad alfa 1, un gen de músculo cardíaco (ATP5A1), un gen hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4) humano, un gen 1 inducido por andrógenos (AIG1) humano, un gen Vic de la subunidad citocromo c oxidasa (COX6C) humano o un gen N-acilesfingosina amidohidrolasa (ceramidasa ácida) 1 (ASA1) humano, o de una variante de los mismos; donde preferiblemente el elemento 5'-UTR no comprende la 5'-TOP de dicho gen.

Por consiguiente, en una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste

15 en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 40%, de preferencia de al menos aproximadamente 50%, de preferencia de al menos aproximadamente 60%, de preferencia de al menos aproximadamente 70%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 80%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 90%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente 95%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 99% con

20 la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las SEQ ID NO: 1368 o SEQ ID NO: 1412-1420 de la solicitud de patente WO2013/143700, o una secuencia de ARN correspondiente, o donde al menos un elemento 5'UTR comprende o consiste en un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 40%, de preferencia de al menos aproximadamente 50%, de preferencia de al menos aproximadamente 60%, de preferencia de al menos aproximadamente 70%, con mayor

25 preferencia de al menos aproximadamente 80%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 90%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente 95%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 1368 o las SEQ ID NO: 1412-1420 de la solicitud de patente WO2013/143700, donde, preferentemente, el fragmento es como se describió anteriormente, es decir, es un tramo continuo de nucleótidos que

30 representa al menos el 20%, etc., de la 5'UTR de longitud total. De preferencia, el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más, preferentemente de al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 40 nucleótidos o más. Preferentemente, el fragmento es un fragmento funcional tal como se describe aquí.

Así, en una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una

35 secuencia de ácido nucleico con una identidad de al menos aproximadamente un 40%, de preferencia de al menos aproximadamente 50%, de preferencia de al menos aproximadamente 60%, de preferencia de al menos aproximadamente 70%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 80%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 90%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente 95%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 99% con la

40 secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 36 (5'-UTR de ATP5A1 sin el tracto de oligopiridina 5' terminal: GCGGCTCGGCCATTTTGTCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCT GCG-GAGTAAGTCAAG; correspondiente a la SEQ ID NO: 1414 de la solicitud de patente WO2013/143700) o, preferentemente, con una secuencia de ARN correspondiente, o donde el al menos un elemento 5'UTR

45 comprende o consiste en un fragmento de una secuencia de ácido nucleico con una identidad de al menos aproximadamente un 40%, de preferencia de al menos aproximadamente 50%, de preferencia de al menos aproximadamente 60%, de preferencia de al menos aproximadamente 70%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 80%, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 90%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente 95%, incluso con mayor preferencia de al menos aproximadamente un 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o, con

50 especial preferencia, con una secuencia de ARN correspondiente, donde, preferentemente, el fragmento es como se describió anteriormente, es decir, es un tramo continuo de nucleótidos que representa al menos el 20%, etc., de la 5'UTR de longitud completa. Preferentemente, el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más, de preferencia de al menos aproximadamente 30

55 nucleótidos o más, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 40 nucleótidos o más. De preferencia, el fragmento es un fragmento funcional tal como se describe aquí.

En una realización preferente adicional, el ARNm inventivo comprende además al menos un elemento

60 3'UTR, que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico derivado de la 3'UTR de un gen de cordado, preferentemente de un gen de vertebrado, con mayor preferencia un gen de mamífero, con total preferencia de un gen humano, o de una variante de la 3'UTR de un gen de cordado, de preferencia de vertebrado, con mayor preferencia de mamífero, con total preferencia de un gen humano.

El término “elemento 3'UTR” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR o de una variante de una 3'UTR. Un elemento 3'UTR en el sentido de la presente invención puede representar la 3'UTR de un ARNm. Así, en el sentido de la presente invención, preferentemente un elemento 3'UTR puede ser la 3'UTR de un ARNm, de preferencia de un ARNm artificial, o puede ser un molde de transcripción para la 3'UTR de un ARNm. De esta forma, un elemento 3'UTR preferentemente es una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la 3'UTR de un ARNm, con preferencia a la 3'UTR de un ARNm artificial, tal como un ARNm obtenido por transcripción de una constructo vector diseñado por ingeniería genética. De preferencia, el elemento 3'UTR cumple con la función de una 3'UTR o codifica para una secuencia que cumple la función de una 3'UTR.

10 Preferentemente, el ARNm inventivo comprende un elemento 3'UTR que se puede derivar de un gen que se relaciona con un ARNm con una vida media mejorada (que proporciona un ARNm estable), por ejemplo un elemento 3'UTR como se define y describe más adelante.

En una realización particularmente preferente, el elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen seleccionado del grupo consistente en un gen de albúmina, un gen de α -globina, un gen de β -globina, un gen de tirosina-hidroxilasa, un gen de lipoxigenasa y un gen de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I), o de una variante de una 3'UTR de un gen seleccionado del grupo consistente en un gen de albúmina, un gen α -globina, un gen β -globina, un gen de tirosina-hidroxilasa, un gen de lipoxigenasa y un gen de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1369-1390 de la solicitud de patente WO2013/143700. En una realización particularmente preferente, el elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen de albúmina, preferentemente de un gen de albúmina de vertebrado, con mayor preferencia de un gen de albúmina de mamífero, con total preferencia de un gen de albúmina humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 24.

3'UTR albúmina humana SEC ID NO: 24:

25 CATCACATTT AAAAGCATCT CAGCCTACCA TGAGAATAAG AGAAAGAAAA TGAAGATCAA
AAGCTTATTC ATCTGTTTT CTTTTCGTT GGTGTAAAGC CAACACCCTG TCTAAAAAAC
ATAAATTTCT TTAATCATTT TGCCTCTTT CTCTGTGCTT CAATTAATAA AAAATGGAAA GAATCT
(correspondiente a la SEQ ID NO: 1369 de la solicitud de patente WO2013/143700).

30 En este contexto, se prefiere particularmente que el ARNm inventivo comprenda un elemento 3'-UTR que comprende una secuencia de ARN correspondiente derivada de los ácidos nucleicos según las SEQ ID NO: 1369-1390 de la solicitud de patente WO2013/143700 o un fragmento, homólogo o variante de las mismas.

Con mayor preferencia, el elemento 3'-UTR comprende la secuencia de ácido nucleico derivada de un fragmento del gen de albúmina humana según la SEQ ID NO: 25:

35 3'UTR de albumina7

CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATT
CATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATT
TTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCT (SEQ ID NO: 25 correspondiente a la SEQ ID NO: 1376 de la solicitud de patente WO2013/143700)

40 En este contexto, es particularmente preferente que el elemento 3'-UTR del ARNm inventivo comprenda o consista en una secuencia de ARN correspondiente con la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 25.

En otra realización particularmente preferente, el elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen de α -globina, preferentemente de un gen de α - o β -globina de vertebrado, con mayor preferencia de un gen de α - o β -globina de mamífero, con total preferencia de un gen de α - o β -globina humano, de acuerdo con las SEQ ID NO: 26-28:

3'-UTR de hemoglobina de Homo sapiens, alfa 1 (HBA1)

50 GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCCTG
CACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (SEQ ID NO:26 correspondiente a la SEQ ID NO: 1370 de la solicitud de patente WO2013/143700)

3'-UTR de hemoglobina de Homo sapiens, alfa 2 (HBA2)

GCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCCTGCCCGCTGGGCCTCCCAACGGGGCCCTCCTCCCCCTCCTTG
CACCGGCCCTTCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCAG (SEQ ID NO: 27 correspondiente a la
SEQ ID NO: 1371 de la solicitud de patente WO2013/143700)

3'-UTR de hemoglobina de Homo sapiens, beta (HBB)

- 5 GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGTTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACACTACTAACTGGG
GGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC (SEQ ID
NO: 28 correspondiente a la SEQ ID NO: 1372 de la solicitud de patente WO2013/143700)

- 10 Por ejemplo, el elemento 3'UTR puede comprender o consistir en la porción central de unión al complejo α de la 3'UTR de un gen de α -globina, tal como un gen de α -globina humana, preferentemente según la SEQ ID NO: 29:

Porción central de unión al complejo α de la 3'UTR de un gen de α -globina (también denominado aquí "muag")

GCCCGATGGGCCTCCCAACGGGGCCCTCCTCCCCCTCCTTGCACCG (SEQ ID NO: 29 correspondiente a la SEQ ID NO: 1393 de la solicitud de patente WO2013/143700).

- 15 En este contexto, es particularmente preferente que el elemento 3'-UTR del ARNm inventivo comprenda o consista en una secuencia de ARN correspondiente de la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 29 o un homólogo, fragmento o variante de la misma.

- 20 El término "una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 3'UTR de un gen [...]" preferentemente se refiere a una secuencia de ácido nucleico basada en la secuencia 3'UTR de un gen [...] o en una parte de la misma, tal como en la 3'UTR de un gen de albúmina, de α -globina, de β -globina, de tirosina-hidroxilasa, de lipoxigenasa o de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I), preferentemente de un gen de albúmina o de una parte del mismo. Este término incluye secuencias que se corresponden con la secuencia 3'UTR completa, es decir, la secuencia 3'UTR de longitud total de un gen, y con secuencias correspondientes a un fragmento de la secuencia 3'UTR de un gen, tal como un gen de albúmina, de α -globina, de β -globina, de tirosina-hidroxilasa, de lipoxigenasa o de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I), con preferencia de un gen de albúmina.

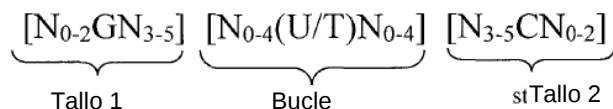
- 30 Preferentemente, el término "una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una variante de la 3'UTR de un gen [...]" se refiere a una secuencia de ácido nucleico basada en una variante de la secuencia de 3'UTR de un gen, tal como una variante de la 3'UTR de un gen de albúmina, de α -globina, de β -globina, de tirosina-hidroxilasa, de lipoxigenasa o de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I), o en una parte de los mismos como se describió anteriormente. Este término incluye secuencias correspondientes a la secuencia completa de la variante de la 3'UTR de un gen, es decir, la secuencia 3'UTR variante de longitud completa de un gen, y las secuencias correspondientes a un fragmento de la secuencia 3'UTR de la variante de un gen. Un fragmento en este contexto preferentemente consiste en un tramo continuo de nucleótidos correspondientes a un tramo continuo de nucleótidos de la variante 3'UTR de longitud completa que representa al menos el 20%, de preferencia al menos el 30%, con mayor preferencia al menos el 40%, con mayor preferencia al menos el 50%, incluso con mayor preferencia al menos el 60%, incluso con mayor preferencia al menos el 70%, incluso con mayor preferencia al menos el 80% y con total preferencia al menos el 90% de la variante 3'UTR de longitud completa. Este fragmento de una variante, en el sentido de
40 la presente invención, preferentemente es un fragmento funcional de una variante como se describe aquí.

Preferentemente, el al menos un elemento 5'UTR y el al menos un elemento 3'UTR actúan sinérgicamente para aumentar la producción de proteínas a partir del ARNm como se describió anteriormente.

- 45 En una realización particularmente preferente, el ARNm inventivo tal como se define en las reivindicaciones adjuntas comprende una secuencia/estructura de tallo-bucle de histona. Estas secuencias tallo-bucle de histona preferentemente se seleccionan de las secuencias tallo-bucle de histona descritas en la WO 2012/019780.

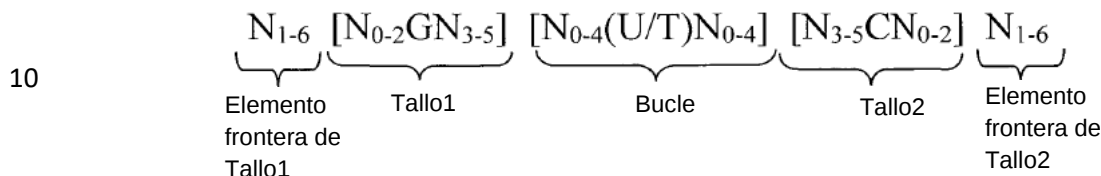
Una secuencia tallo-bucle de histona adecuada para su uso en la presente invención preferentemente se selecciona de al menos una de las siguientes fórmulas (I) o (II):

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



5

fórmula (II) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera del tallo):



15 donde:

elementos frontera del tallo1 o tallo2 N_{1-6} : es una secuencia consecutiva de 1 a 6, preferiblemente de 2 a 6, más preferiblemente de 2 a 5, aún más preferiblemente de 3 a 5, más preferiblemente de 4 a 5 o de 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de entre A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

20 tallo1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$: es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa con el elemento tallo2 y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, preferiblemente de 0 a 1, más preferiblemente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, preferiblemente de 4 a 5, más preferiblemente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanosina o un análogo del mismo, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, siempre que su citidina de nucleótido complementario en tallo2 se reemplace por guanosina;

30 secuencia bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$: se ubica entre los elementos tallo1 y tallo2 y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, más preferiblemente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independiente de otra secuencia consecutiva de 0 a 4, preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1 a 2 N, donde cada N se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

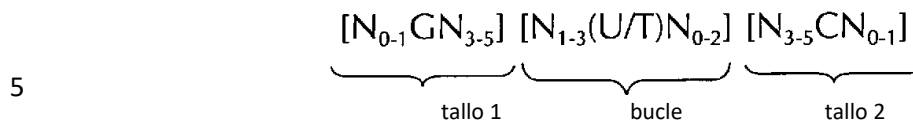
35 tallo2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$: es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa al elemento tallo1 y es una secuencia consecutiva de 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, preferiblemente de 4 a 5, más preferiblemente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; siendo N_{0-2} una secuencia consecutiva de 0 a 2, preferiblemente de 0 a 1, más preferiblemente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma siempre que su guanosina de nucleósido complementario en tallo1 se reemplace por citidina;

45 donde tallo1 y tallo2 son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia inversa complementaria, donde el apareamiento de bases puede ocurrir entre tallo1 y tallo2, por ejemplo por apareamiento de bases Watson-Crick de nucleótidos A y U/T o G y C o por apareamiento de bases no Watson-Crick, por ejemplo apareamiento de bases de tambaleo, apareamiento de bases Watson-Crick inverso, apareamiento de bases Hoogsteen, apareamiento de bases Hoogsteen inverso o son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un apareamiento de bases incompleto puede ocurrir entre tallo1 y tallo2, en base a que una o más bases en un tallo no tienen una base complementaria en la secuencia complementaria inversa del otro tallo.

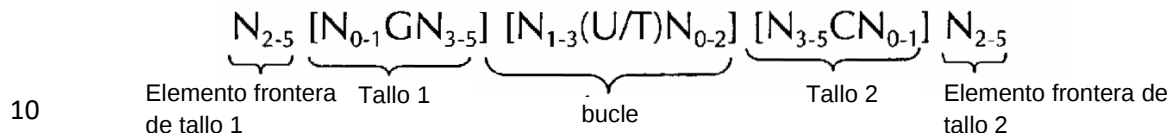
50 De acuerdo con una realización particularmente preferente adicional del primer aspecto de la invención, la secuencia de ARNm inventivo puede comprender al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ia) o (IIa):

De acuerdo con una realización preferida adicional del primer de la presente descripción, la secuencia de ARNm puede comprender al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ia) o (IIa):

fórmula (Ia) (secuencia de tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



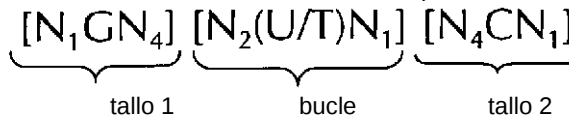
fórmula (IIa) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



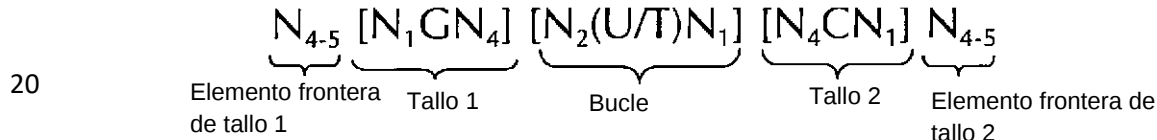
donde N, C, G, T y U son como se definen anteriormente.

De acuerdo con una realización adicional más particularmente preferida del primer aspecto, el al menos un ARN puede comprender al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ib) o (IIb):

fórmula (Ib) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (IIb) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



donde N, C, G, T y U son como se definen anteriormente.

Una secuencia tallo-bucle de histona particularmente preferente es la secuencia según la SEQ ID NO: 30 CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA o, con mayor preferencia, la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30 (CAAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCA SEQ ID NO: 37).

En una realización particularmente preferente del primer aspecto de la presente invención, el ARNm inventivo comprende además la región codificante como se define en las reivindicaciones adjuntas, una secuencia poli(A), también denominada cola poli(A), preferentemente en el terminal 3' del ARNm inventivo. Cuando está presente, esta secuencia poli(A) comprende una secuencia de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, con preferencia una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nucleótidos de adenosina, con mayor preferencia una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de adenosina, incluso con mayor preferencia una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina, con total preferencia una secuencia de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenosina. En este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a una desviación de $\pm 10\%$ de los valores a los que refiere. Esta secuencia poli(A) preferentemente se localiza 3' de la región codificante comprendida en el ARNm inventivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con una realización preferente adicional, el ARNm inventivo puede estar modificado con una secuencia de al menos 10 citosinas, preferentemente al menos 20 citosinas, con mayor preferencia al menos 30 citosinas (denominada "secuencia poli(C)"). En particular, el ARNm puede contener una secuencia poli(C) típica de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citosina, de preferencia de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, con mayor preferencia de aproximadamente 10 a 70

nucleótidos de citosina o incluso con mayor preferencia de aproximadamente 20 a 50 o incluso de 20 a 30 nucleótidos de citosina. Esta secuencia poli(C) preferentemente se ubica 3' de la región codificante, con mayor preferencia 3' de una secuencia poli(A) opcional comprendida en el ARNm inventivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

5 En este contexto, la secuencia de ARNm inventiva puede comprender, en una realización específica:

- a) una estructura 5'-CAP, preferentemente m7GpppN;
- b) una región codificante que codifica para al menos un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje;
- 10 c) una secuencia poli(A) que preferentemente comprende 64 adenosinas; y
- 15 d) opcionalmente, una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas.

En una realización particularmente preferente del primer aspecto de la presente invención, el ARNm inventivo preferentemente comprende en la dirección 5'- a 3'-:

- a) una estructura 5'-CAP, preferentemente m7GpppN;
- 20 b) una región codificante que codifica para al menos un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje;
- 25 c) una secuencia poli(A) que preferentemente comprende 64 adenosinas;
- d) opcionalmente, una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y
- 30 e) un tallo-bucle de histona, preferentemente comprendiendo la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.

En otra realización particularmente preferente del primer aspecto de la presente invención, el ARNm inventivo preferentemente comprende en la dirección 5'- a 3'-:

- a) una estructura 5'-CAP, preferentemente m7GpppN;
- 35 b) una región codificante que codifica para al menos un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje;
- 40 c) opcionalmente un elemento 3'-UTR derivado de un gen de alfa-globina, preferentemente comprendiendo la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 29, un homólogo, fragmento o variante de la misma;
- 45 d) una secuencia poli(A) que preferentemente comprende 64 adenosinas;
- e) opcionalmente, una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y
- f) un tallo-bucle de histona, preferentemente comprendiendo la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.

50 En otra realización particularmente preferente, el ARNm inventivo preferentemente comprende en la dirección 5'- a 3'-:

- a) una estructura 5'-CAP, preferentemente m7GpppN;
- b) opcionalmente un elemento 5'-UTR derivado de un gen TOP, preferentemente derivado de la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 23, un homólogo, fragmento o variante de la misma;
- 55

- 5 c) una región codificante que codifica para al menos un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje;
- 10 d) opcionalmente un elemento 3'UTR derivado de un gen que proporciona un ARNm estable, preferentemente derivado de la secuencia de ARN correspondiente a una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 25, un homólogo, fragmento o variante de la misma;
- e) una secuencia poli(A) que preferentemente comprende 64 adenosinas;
- f) opcionalmente, una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y
- 15 g) un tallo-bucle de histona, preferentemente comprendiendo la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.

De acuerdo con la presente descripción, la región codificante podría codificar al menos parcialmente una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 1-11 o fragmentos, variantes o derivados de las mismas. Además, la región codificante del ARNm puede codificar para una combinación de al menos dos de estas secuencias de aminoácidos o una combinación de fragmentos, variantes o derivados de las mismas. También se describe en este contexto una combinación de la proteína de fusión F con la nucleoproteína N y una combinación de la proteína de fusión F y la proteína M2-1.

Adicionalmente, la región codificante podría ser o podría comprender al menos una de las secuencias según la SEQ ID NO: 12 a la SEQ ID NO: 22, o fragmentos, homólogos o variantes de las mismas. Además, el ARNm podría comprender una combinación de al menos dos de estas secuencias o una combinación de fragmentos, homólogos o variantes de las mismas.

Para una mejora adicional de la resistencia a, por ejemplo, la degradación *in vivo* (por ejemplo por una exo- o endo-nucleasa), el ARNm inventivo se puede proporcionar como un ácido nucleico estabilizado, por ejemplo en forma de un ácido nucleico modificado. De acuerdo con una realización adicional de la invención, es así preferente que el ARNm inventivo esté estabilizado, preferentemente mediante modificaciones de esqueleto, modificaciones de azúcar y/o modificaciones de bases, con mayor preferencia estabilizado por la modificación del contenido en G/C. Todas estas modificaciones se pueden introducir en el ARNm inventivo sin afectar a la función del ARNm a ser traducido en la función antigénica derivada del péptido o proteína del virus respiratorio sincitial (RSV).

Una modificación estructural en el contexto de la presente invención preferentemente es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de nucleótidos contenido en el ARNm inventivo están químicamente modificados, por ejemplo el enlace internucleosídico aniónico, modificaciones N3'→P5', reemplazamiento de átomos de oxígeno no puenteados por boranos, enlaces internucleósidos neutros, enlace amida de los nucleósidos, enlaces metileno(metilimino), enlaces formacetal y tioformacetal, introducción de grupos sulfonilo o similares.

Una modificación de azúcar en el contexto de la presente invención preferentemente es una modificación química del azúcar de los nucleótidos del ARNm inventivo, por ejemplo la metilación del residuo ribosa o similares.

Según la invención, el ARNm inventivo está modificado y así estabilizado por el aumento del contenido de G(guanosina)/C(citosina) de la región codificante del ARNm tal como se define en las reivindicaciones.

Aquí, el contenido de G/C de la región codificante del ARNm inventivo está en particular incrementado en comparación con el contenido de G/C de la región codificante de su secuencia codificante de tipo salvaje, es decir del ARNm no modificado. Sin embargo, la secuencia codificada de aminoácidos del ARNm inventivo no está modificada en comparación con la secuencia codificada de aminoácidos del ARNm tipo salvaje/no modificado particular.

La modificación del contenido G/C del ARNm inventivo se basa en el hecho de que las secuencias de ARN que tiene un contenido aumentado de G (guanosina)/C (citosina) son más estables que las secuencias de ARN que tienen un contenido aumentado de A (adenosina)/U (uracilo). Los codones de una secuencia codificante o de un ARN completo, por tanto podrían variar en comparación con la secuencia codificante o del ARNm de tipo salvaje de forma que incluyan una cantidad aumentada de nucleótidos de G/C, a la vez que se mantiene la secuencia de aminoácidos traducida. Con respecto al hecho de que diversos codones

codifican para uno y el mismo aminoácido (la denominada degeneración del código genético), pueden determinarse los codones más favorables para la estabilidad (el denominado uso alternativo de codones). El contenido en G/C de la región codificante del ARNm inventivo según la invención se aumenta en al menos un 70%, preferentemente en al menos un 80%, y con particular en al menos un 90%, 95% o incluso 100% de los codones que se pueden sustituir en la región codificante para una proteína como se define en las reivindicaciones o están sustituidos en la secuencia completa de la región de codificación de la secuencia de ARNm tipo salvaje, aumentando así el contenido de G/C dicha la secuencia. En este contexto, es particularmente preferente aumentar el contenido en G/C del ARNm inventivo al máximo (es decir, el 100% de los codones sustituibles), en particular en la región codificante, en comparación con la secuencia de tipo salvaje.

De acuerdo con una realización preferente adicional de la invención, el ARNm inventivo se optimiza para la traducción, preferentemente se optimiza para la traducción reemplazando los codones para los ARNt menos frecuentes de un aminoácido determinado por codones para los ARNt que se presentan con mayor frecuencia del aminoácido respectivo. Esto se basa en el descubrimiento de que la eficacia de la traducción también está determinada por una frecuencia diferente en la presencia de los ARNt en las células. Así, si los denominados "codones menos frecuentes" están presentes en el ARNm inventivo en un grado aumentado, el ARN modificado correspondiente se traduce en un grado significativamente más deficiente que en caso de que estén presentes codones que codifican para los ARNt más frecuentes. Preferentemente, la región codificante del ARNm inventivo está modificada en comparación con la región codificante correspondiente de la secuencia de ARN de tipo salvaje de forma que al menos un codón de la secuencia de tipo salvaje que codifica para un ARNt que es relativamente raro o menos frecuente en la célula es intercambiado por un codón que codifica para un ARNt que es más o el más frecuente en la célula y porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro o menos frecuente. Mediante esta modificación, las secuencias del ARNm inventivo se pueden modificar de forma que se insertan codones para los cuales están disponibles los ARNt que se presentan con mayor frecuencia. En otras palabras, de acuerdo con la invención, mediante esta modificación todos los codones de la secuencia de tipo salvaje que codifican para un ARNt que es relativamente raro en la célula en cada caso se pueden intercambiar por un codón que codifica para un ARNt respectivo relativamente frecuente en la célula y que, en cada caso, porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Además, es particularmente preferente enlazar el contenido de G/C secuencial que se aumenta, en particular se maximiza, en el ARNm inventivo con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la región codificante del ARNm inventivo o de la región codificante. Esta realización preferente permite proporcionar un ARNm inventivo especialmente traducido y estabilizado eficiente (modificado).

Las sustituciones, adiciones o eliminaciones de las bases preferentemente se llevan a cabo utilizando una matriz de ADN para la preparación de la molécula de ácido nucleico por las técnicas bien conocidas de mutagénesis sitio-dirigida o por una unión de oligonucleótidos. En tales procesos, para la preparación del menos un ARN de la vacuna de la combinación inventiva como se define aquí, se puede transcribir *in vitro* una molécula de ADN correspondiente. Esta matriz de ADN preferentemente comprende un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, que es seguida mediante la secuencia deseada de nucleótidos para el al menos un ARN a preparar y por una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que forma la matriz del al menos un ARN de interés puede prepararse mediante proliferación fermentativa y aislamiento posterior como parte de un plásmido que se pueda replicar en bacterias. Plásmidos que se pueden mencionar como adecuados para la presente invención son, por ejemplo, los plásmidos pT7T (número de acceso GenBank U26404; Lai *et al.*, Development 1995, 121: 2349 a 2360), pGEM® series, por ejemplo pGEM®-1 (número de acceso GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso GenBank X65327); véase también, Mezei and Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

En una realización particularmente preferente, la secuencia de ARNm inventivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención preferentemente comprende en la dirección 5'- a 3'-:

- a) una estructura 5'-CAP tal como se define aquí, preferentemente m7GpppN;
- b) una región codificante que codifica para al menos un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje;

- 5 c) un elemento 3'-UTR como se define aquí, preferentemente derivado de un gen que proporciona un ARNm estable, en especial la secuencia de ARN correspondiente de la molécula de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 29, o un homólogo, fragmento o variante de la misma;
- d) una secuencia poli(A) que preferentemente comprende 64 adenosinas;
- e) opcionalmente, una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y
- f) al menos una secuencia tallo-bucle de histona, preferentemente la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.

En una realización particularmente preferente adicional, la secuencia del ARNm inventivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención preferentemente comprende en la dirección 5' - a 3':

- 10 a) una estructura 5'-CAP tal como se define aquí, preferentemente m7GpppN;
- b) un elemento 5'-UTR como se define aquí, preferentemente un elemento 5'-UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'-UTR de un gen TOP, preferentemente de la 5'-UTR de la proteína ribosómica humana Large 32 sin el tracto oligopirimidina 5' terminal según la SEQ ID NO: 23 o la secuencia de ARN correspondiente; o un fragmento, homólogo o variante de la misma;
- 15 c) una región codificante que codifica para al menos un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje;
- 20 d) un elemento 3'-UTR, preferentemente el elemento 3'-UTR de albúmina humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 24 o el ARN correspondiente, o un homólogo, fragmento o variante de los mismos;
- 25 e) una secuencia poli(A), que preferentemente comprende 64 adenosinas;
- f) opcionalmente, una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y
- g) al menos una secuencia tallo-bucle de histona, preferentemente la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.

- 30 En una realización especialmente preferente, la secuencia de ARNm inventiva comprende o consiste en las secuencias mostradas en la figura 3, de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.

- En realizaciones específicas adicionales, el ARNm de acuerdo con la invención puede comprender además una secuencia de sitio de entrada ribosómico interno (IRES) o un motivo IRES, que puede separar diversos marcos de lectura abiertos, por ejemplo si el ARNm inventivo codifica para dos o más péptidos o proteínas antigénicos. Una secuencia IRES puede ser particularmente útil cuando el ARNm es un ARNm bi- o multicistónico.
- 35

Adicionalmente, el ARNm inventivo se puede preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos sintéticos, tales como síntesis en fase sólida, así como métodos *in vitro*, como reacciones de transcripción *in vitro*.

- 40 De acuerdo con una realización de la presente invención, el ARNm que comprende una región codificante como se define en las reivindicaciones se puede administrar desnudo, sin asociarse a ningún vehículo adicional, agente de transfección o complejación, para aumentar la eficiencia de transfección y/o las propiedades inmunoestimuladoras del ARNm inventivo o del ácido nucleico comprendido adicional.

- 45 En una realización preferente, el ARNm inventivo se puede formular junto con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico. Por consiguiente, en una realización adicional de la invención, es preferente que el ARNm inventivo o cualquier otro ácido nucleico comprendido en la composición farmacéutica o en la vacuna aquí descritas esté asociado o complejoado con un compuesto catiónico o policatiónico o con un vehículo polimérico, opcionalmente en una proporción en peso seleccionada de un rango de aproximadamente 6:1 (p/p) a aproximadamente 0,25:1 (p/p), con mayor preferencia de
- 50 aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), incluso con mayor preferencia de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), y con total preferencia en una proporción de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p) ARNm o ácido nucleico: compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico; u opcionalmente en una proporción nitrógeno/fosfato del ARNm o del ácido nucleico: compuesto
- 55 catiónico o policatiónico y/o vehículo polimérico en el rango de aproximadamente 0,1-10, de preferencia en el rango de aproximadamente 0,3-4 o 0,3-1 y con total preferencia en un rango de aproximadamente 0,5-1

o 0,7-1, e incluso con mayor preferencia en el rango de aproximadamente 0,3-0,9 o 0,5-0,9.

Así, el ARNm inventivo o cualquier otro ácido nucleico comprendido en la composición farmacéutica o en la vacuna aquí descritas también puede estar asociado con un vehículo, con un agente de transfección o con un agente de complejación para aumentar la eficiencia de transfección y/o las propiedades inmunostimuladoras del ARNm inventivo y de los ácidos nucleicos adicionales opcionales incluidos.

Compuestos catiónicos o policationicos que son agentes particularmente preferidos en este contexto incluyen protamina, nucleolina, espermina o espermidina u otros péptidos o proteínas catiónicos, como poli-L-lisina (PLL), poliarginina, polipéptidos básicos, péptidos penetrantes celulares (CPP), incluyendo péptidos que se unen a VIH, Tat-VIH (VIH), péptidos derivados de Tat, penetratina, péptidos derivados de VP22 o análogos, HSV VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA o dominios de transducción de proteínas (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, péptido(s) MPG, Pep-1, oligómeros L, péptido(s) de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (particularmente de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, lactoferrina, transportano, Buforina-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP o histonas.

En este contexto, se prefiere particularmente la protamina.

Además, las proteínas o péptidos catiónicos o policationicos preferentes pueden seleccionarse de las siguientes proteínas o péptidos de la siguiente fórmula total (III):



donde $l + m + n + o + x = 8-15$, y l, m, n u o , independientemente, puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, siempre que el contenido global de Arg, Lys, His y Orn representa al menos 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos nativos (= que se presentan naturalmente) o no nativos excepto Arg, Lys, His u Orn; y x puede ser cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3 o 4, siempre que el contenido total de Xaa no exceda el 50% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Son particularmente preferentes en este contexto por ejemplo los péptidos catiónicos Arg₇, Arg₈, Arg₉, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R, etc. A este respecto, se incorpora aquí por referencia la descripción de la WO2009/030481.

Además, compuestos catiónicos o policationicos preferentes que pueden usarse como agentes de transfección o complejación pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenimina (PEI), lípidos catiónicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-ioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil fosfatidiletanol amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de dimiristo-oxipropil-dimetilhidroxietil-amonio, DOTAP: dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)-propano, DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α-trimetilamonioacetil)-dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietil)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-di-hexadeciloxipropil-oximetiloxi)etil]-trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-di-hexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etil]-trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policationicos, por ejemplo poliaminoácidos modificados, como β-aminoácido-polímeros o poliamidas invertidas, etc., polietilenos modificados, tal como PVP (poli(bromuro de N-etil-4-vinilpiridinio)), etc., acrilatos modificados, como pDMAEMA (poli(dimetilaminoetil metilacrilato)), etc., amidoaminas modificadas tal como pAMAM (poli(amidoamina)), etc., polibetaaminoéster modificado (PBAE), tal como diamina y polímeros 1,4-butanodiol-diacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados, etc., dendrímeros, como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros basados en pAMAM, etc., poliimina(s), tal como PEI: poli(etilenimina), poli(propilenimina), etc., polialilamina, polímeros basados en estructura de azúcar, tal como polímeros basados en ciclodextrina, polímeros basados en dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en estructuras silano, tal como copolímeros PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque que consisten en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionados de un polímero catiónico como se mencionó arriba) y de uno o más bloques hidrofílicos o hidrofóbicos (por ejemplo polietilenglicol); etc.

Un portador polimérico utilizado de acuerdo con la invención podría ser un portador polimérico formado mediante componentes catiónicos reticulados con disulfuro. Los componentes catiónicos reticulados con disulfuro pueden ser iguales o diferentes entre sí. El portador polimérico también puede contener componentes adicionales. También se prefiere particularmente que el portador polimérico utilizado de acuerdo con la presente invención comprenda mezclas de péptidos, proteínas o polímeros catiónicos y opcionalmente componentes adicionales como se define aquí, que se reticulan por enlaces disulfuro como se describe aquí. En este contexto, se hace referencia a la descripción de la WO 2012/013326.

En este contexto, los componentes catiónicos que forman la base para el portador polimérico por reticulación con disulfuro se seleccionan típicamente de cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico adecuado para este fin, en particular cualquier péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico, capaz de complejar un ARNm o un ácido nucleico como se define aquí, y, por ello, preferentemente condensar el ARNm o el ácido nucleico. El péptido, proteína o polímero catiónico o policatiónico preferentemente es una molécula lineal, sin embargo, también se pueden utilizar péptidos, proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos ramificados.

Cada proteína, péptido o polímero catiónico o policatiónico reticulado con disulfuro del portador polimérico que puede ser utilizado para complejar el ARNm inventivo o cualquier ácido nucleico adicional comprendido en la composición farmacéutica inventiva o en la vacuna aquí descrita contiene al menos un porción -SH, con mayor preferencia al menos un residuo cisteína o cualquier grupo químico adicional que presente una porción -SH capaz de formar un enlace disulfuro con la condensación con al menos una proteína péptido o polímero catiónico o policatiónico como un componente catiónico del portador polimérico como se menciona aquí.

Como se definió anteriormente, el portador polimérico que se puede utilizar para complejar el ARNm inventivo o cualquier ácido nucleico adicional comprendido en la composición farmacéutica inventiva o en la vacuna aquí descrita puede estar formado por componentes catiónicos (o policatiónicos) reticulados con disulfuro.

Preferentemente, estos péptidos o proteínas o polímeros catiónicos o policatiónicos del portador polimérico que comprenden o están modificados adicionalmente para comprender al menos una porción -SH se seleccionan de proteínas, péptidos y polímeros como se han definido anteriormente para los agentes de complejación.

En una realización particular adicional, el portador polimérico que se puede utilizar para complejar el ARNm inventivo o cualquier ácido nucleico adicional comprendido en la composición farmacéutica de la invención o en la vacuna aquí descrita se puede seleccionar de una molécula portadora polimérica de acuerdo con la fórmula genérica (IV):



donde

P^1 y P^3 son diferentes o idénticos y representan una cadena de polímero hidrofílico lineal o ramificada, cada P^1 y P^3 tiene al menos una porción -SH- capaz de formar un enlace disulfuro sobre la condensación con el componente P^2 , o alternativamente con (AA), $(AA)_x$, o $[(AA)_x]_z$ si tales componentes se usan como enlazante entre P^1 y P^2 o P^3 y P^2 y/o con componentes adicionales (por ejemplo (AA), $(AA)_x$, $[(AA)_x]_z$ o L), la cadena de polímero hidrofílico lineal o ramificada se seleccionada independientemente de polietilenglicol (PEG), poli-N-(2-hidroxipropil)metacrilamida, poli-2-(metacrililoiloxi)etil-fosforilcolinas, poli(hidroxialquil-L-asparagina), poli(2-(metacrililoiloxi)etil-fosforilcolina), hidroxietil-almidón o poli(hidroxialquil-L-glutamina), donde la cadena de polímero hidrofílico tiene un peso molecular de alrededor de 1 kDa a alrededor de 100 kDa, preferiblemente de alrededor de 2 kDa a alrededor de 25 kDa; o más preferiblemente de alrededor de 2 kDa a alrededor de 10 kDa, por ejemplo alrededor de 5 kDa a alrededor de 25 kDa o 5 kDa a alrededor de 10 kDa;

P^2 es una proteína o péptido catiónico o policatiónico, por ejemplo como se definió arriba para el portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados, y preferiblemente de una longitud de alrededor de 3 a alrededor de 100 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de alrededor de 3 a alrededor de 50 aminoácidos, aún más preferiblemente de una longitud de alrededor de 3 a alrededor de 25 aminoácidos, por ejemplo una longitud de alrededor de 3 a 10, 5 a 15, 10 a 20 o 15 a 25 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de alrededor de 5 a alrededor de 20 y aún más preferiblemente una longitud de alrededor de 10 a alrededor de 20; o es un polímero catiónico o policatiónico, por ejemplo como se definió arriba para el portador polimérico formado por componentes catiónicos disulfuro-reticulados, típicamente con un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a alrededor de 30 kDa, incluyendo un peso molecular de alrededor de 1 kDa a alrededor de 20 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 1,5 kDa a alrededor de 10 kDa, o con un peso molecular de alrededor de 0,5 kDa a alrededor de 100 kDa, incluyendo un peso molecular de alrededor de 10 kDa a alrededor de 50 kDa, aún más preferiblemente de alrededor de 10 kDa a alrededor de 30 kDa; teniendo cada P^2 al menos dos porciones -SH, capaces de formar un enlace disulfuro sobre la condensación con componentes adicionales P^2 o componente(s) P^1 y/o P^3 o alternativamente con componentes adicionales (por ejemplo (AA), $(AA)_x$, o $[(AA)_x]_z$);

-S-S- es un enlace disulfuro (reversible) (los corchetes se omiten para una mejor legibilidad), donde S preferiblemente representa azufre o una porción que lleva -SH, que forma un enlace disulfuro (reversible). El enlace disulfuro (reversible) se forma preferiblemente por condensación de porciones -SH- de cualquiera de los componentes P¹ y P², P² y P², o P² y P³, u opcionalmente de componentes adicionales como se definen aquí (por ejemplo L, (AA), (AA)_x, [(AA)_x]_z, etc.); La porción -SH- puede ser parte de la estructura de estos componentes o agregarse por una modificación como se define abajo;

L es un ligando opcional, que puede estar o no presente, y se puede seleccionar independientemente de RGD, transferrina, folato, un péptido señal o secuencia señal, una secuencia o señal de localización, una secuencia o señal de localización nuclear (NLS), un anticuerpo, un péptido de penetración celular, (por ejemplo TAT o KALA), un ligando de un receptor (por ejemplo citoquinas, hormonas, factores de crecimiento etc.), moléculas pequeñas (por ejemplo carbohidratos como manosa o galactosa o ligandos sintéticos), agonistas de molécula pequeña, inhibidores o antagonistas de receptores (por ejemplo análogos peptidomiméticos RGD), o cualquier proteína adicional como se define aquí, etc.;

n es un entero, típicamente seleccionado de un intervalo de alrededor de 1 a 50, preferiblemente de un intervalo de alrededor de 1, 2 o 3 a 30, más preferiblemente de un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 25, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 20, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 15, o un intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, incluyendo por ejemplo un intervalo de alrededor de 4 a 9, 4 a 10, 3 a 20, 4 a 20, 5 a 20 o 10 a 20, o un intervalo de alrededor de 3 a 15, 4 a 15, 5 a 15 o 10 a 15, o un intervalo de alrededor de 6 a 11 o 7 a 10. Más preferiblemente, n está en el intervalo de alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 a 9, en el intervalo de alrededor de 1, 2, 3 o 4 a 8, o en el intervalo de alrededor de 1, 2 o 3 a 7.

En este contexto, se hace referencia a la descripción de la WO 2011/026641. Cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ típicamente tienen al menos una porción -SH-, donde la al menos una porción -SH- es capaz de formar un enlace disulfuro por reacción con el componente P² o con componente el (AA) o (AA)_x, si se usa como enlazante entre P¹ y P² o P³ y P² como se define abajo y opcionalmente con un componente adicional, por ejemplo L y/o (AA) o (AA)_x, por ejemplo si existen dos o más porciones -SH-. Las siguientes subfórmulas "P¹-S-S-P²" y "P²-S-S-P³" dentro de la fórmula genérica (V) anterior (los corchetes se omiten para una mejor legibilidad), donde cualquiera de S, P¹ y P³ son como se definen aquí, típicamente representan una situación donde una porción -SH- de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ se condensa con una porción -SH- del componente P² de la fórmula genérica (V) anterior, formando ambos azufres de estas porciones -SH- un enlace disulfuro -S-S- como se define aquí en la fórmula (V). Estas porciones -SH- son proporcionadas típicamente por cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³, por ejemplo mediante una cisteína interna o cualquier aminoácido adicional (modificado) o compuesto que tenga una porción -SH-. En consecuencia, las subfórmulas "P¹-S-S-P²" y "P²-S-S-P³" también pueden ser escritas como "P¹-Cys-Cys-P²" y "P²-Cys-Cys-P³", si la porción -SH- se proporciona por una cisteína, en donde el término Cys-Cys representa dos cisteínas acopladas por un enlace disulfuro, no por un enlace peptídico. En este caso, el término "-S-S-" en estas fórmulas también puede escribirse como "-S-Cys", como "-Cys-S" o como "-Cys-Cys-". En este contexto, el término "-Cys-Cys-" no representa un enlace peptídico sino un enlace de dos cisteínas por sus porciones -SH- para formar un enlace disulfuro. En consecuencia, el término "-Cys-Cys-" también se puede entender generalmente como "-(Cys-S)-(S-Cys)-", donde en este caso específico S indica el azufre de la porción -SH- de la cisteína. Igualmente, los términos "-S-Cys" y "-Cys-S" indican un enlace disulfuro entre una porción que contiene -SH y una cisteína, que también puede escribirse como "-S-(S-Cys)" y "-(Cys-S)-S". Alternativamente, los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ se pueden modificar con una porción -SH, preferiblemente por una reacción química con un compuesto que lleva una porción -SH, de manera que cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ lleva al menos una de tales porciones -SH. Tal compuesto que lleva una porción -SH puede ser por ejemplo una cisteína (adicional) o cualquier aminoácido adicional (modificado) que tenga una porción -SH. Tal compuesto también puede ser cualquier porción o compuesto no amino que contiene o permite introducir una porción -SH en los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ como se definen aquí. Tales compuestos no amino se pueden enlazar a los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ de fórmula (VI) del portador polimérico de acuerdo con la presente invención por reacciones químicas o enlace de compuestos, por ejemplo por enlace de un ácido 3-tiopropiónico o tioimolano, por formación de amida (por ejemplo ácidos carboxílicos, ácidos sulfúricos, aminas, etc.), por adición Michael (por ejemplo porciones de maleinimida, carbonilos α,β-insaturados, etc.), por química clic (por ejemplo azidas o alquinos), por metátesis de alqueno/alquino (por ejemplo alquenos o alquinos), formación de imina o hidrozona (aldehídos o cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas), reacciones de formación de complejo (avidina, biotina, proteína G) o componentes que permiten reacciones de sustitución tipo S_N (por ejemplo haloalcanos, tioles, alcoholes, aminas, hidrazinas, hidrazidas, ésteres de ácido sulfónico, sales de oxifosfonio) u otras porciones químicas que se pueden utilizar en el enlace de componentes adicionales. Un derivado PEG particularmente preferido en este contexto es alfa-metoxi-omega-mercapto-poli(etilenglicol). En cada caso, la porción SH, por ejemplo de una cisteína o de cualquier aminoácido adicional (modificado) o compuesto, puede estar presente en los extremos terminales o internamente en

5 cualquier posición de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³. Como se define aquí, cada uno de los polímeros hidrofílicos P¹ y P³ típicamente tiene al menos una porción -SH- preferiblemente en un extremo terminal, pero también pueden contener dos o aún más porciones -SH-, que se pueden usar para enlazar adicionalmente componentes adicionales como se definen aquí, preferiblemente péptidos o proteínas funcionales adicionales, por ejemplo un ligando, un componente aminoácido (AA) o (AA)_x, anticuerpos, péptidos penetradores de la célula o péptidos potenciadores (por ejemplo TAT, KALA), etc.

10 En este contexto, se prefiere particularmente que el ARNm inventivo esté complejado al menos parcialmente con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un vehículo polimérico, preferiblemente proteínas o péptidos catiónicos. En este contexto, se hace referencia a la descripción de las WO 2010/037539 y WO 2012/113513. Parcialmente significa que solo una parte del ARN está complejada con un compuesto catiónico y que el resto del ARN está (comprendido en la composición) en forma no compleja ("libre"). Preferiblemente, la relación ARN complejado:ARN libre (en la composición) se selecciona de un intervalo de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 1:10 (p/p), más preferiblemente de un intervalo de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:8 (p/p), incluso más preferiblemente de un rango de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p), y con total preferencia, la relación ARN complejado:ARN libre en la composición se selecciona de una relación de aproximadamente 1:1 (p/p).

20 El ARNm complejado en la composición farmacéutica inventiva o en la vacuna aquí descrita preferentemente se prepara de acuerdo con un primer paso de complejar el ARNm inventivo con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico, preferentemente como se define aquí, en una proporción específica, para formar un complejo estable. En este contexto, es especialmente preferente que ni el compuesto catiónico o policatiónico libre o el portador polimérico ni sólo una pequeña cantidad insignificante del mismo permanezca en el componente del ARNm complejado después de la complejación del ARNm. Por consiguiente, la proporción entre el ARNm y el compuesto catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico en el componente ARNm complejado típicamente se selecciona en un rango tal que el ARNm esté completamente complejado y sin ningún compuesto catiónico o policatiónico libre o portador polimérico, sin que ni siquiera una cantidad insignificamente pequeña del mismo permanezca en la composición.

30 De preferencia, la proporción entre el ARNm y el compuesto catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico, de preferencia como se define aquí, se selecciona de un rango de aproximadamente 6:1 (p/p) a aproximadamente 0,25:1 (p/p), preferentemente de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente 0,5:1 (p/p), con mayor preferencia de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p) o de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:1 (p/p), y con total preferencia en un rango de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 2:1 (p/p). Alternativamente, la proporción entre el ARNm y el compuesto catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico, de preferencia como se define aquí, en el componente del ARNm complejado también se puede calcular en base a la proporción nitrógeno/fosfato (proporción N/P) del complejo completo. En el contexto de la presente invención, una proporción N/P preferente está en el intervalo de aproximadamente 0,1-10, de preferencia en de aproximadamente 0,3-4 y con total preferencia de aproximadamente 0,5-2 o 0,7-2 con respecto a la proporción ARNm:compuesto catiónico o policatiónico y/o portador polimérico, preferentemente como se define aquí, en el complejo, y con mayor preferencia en un intervalo de aproximadamente 0,7-1,5, 0,5-1 o 0,7-1, e incluso con la máxima preferencia de aproximadamente 0,3-0,9 o 0,5-0,9, preferentemente con la condición de que el compuesto catiónico o policatiónico en el complejo sea una proteína o péptido catiónico o policatiónico y/o el portador polimérico como se definió anteriormente. En esta realización específica, el ARNm complejado también está incluido en el término "componente adyuvante".

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad o más de una, de preferencia de 2 a 10, con mayor preferencia de 2 a 5, con total preferencia de 2 a 4 de las secuencias de ARNm como se definen aquí. Estas composiciones inventivas comprenden más de una secuencia de ARNm que preferentemente codifican para diferentes péptidos o proteínas que comprenden preferentemente diferentes antígenos patógenos o fragmentos, variantes o derivados de los mismos. De éstos, al menos una secuencia de ARNm comprende una región codificante que codifica para un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje y al menos una secuencia de ARNm codifica para al menos un péptido o proteína antigénico derivado de otro antígeno del virus respiratorio sincitial (RSV), en particular de la nucleoproteína N o la proteína M2-1.

Combinaciones de antígenos descritas en este contexto son:

- F + G (serotipo A) + G (serotipo B)
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + M2-1
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N
- 5 • F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + M2-1
- F + M2-1 + N
- F + M2-1
- F + N
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + M2-1 + P + M2-2 + M + L
- 10 • F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + M2-1 + P + M2-2 + M
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + M2-1 + P + M2-2 + L
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + M2-1 + P + M + L
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + M2-1 + M2-2 + M + L
- F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + N + P + M2-2 + M + L
- 15 • F + G (serotipo A) + G (serotipo B) + M2-1 + P + M2-2 + M + L

20 Por consiguiente, en un aspecto adicional particularmente preferente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprende al menos una secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o una composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivo como se definen aquí y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como un primer ingrediente, la composición farmacéutica inventiva comprende al menos una secuencia de ARNm inventivo como se define aquí.

25 Como un segundo ingrediente, la composición farmacéutica inventiva opcionalmente puede comprender al menos un componente farmacéuticamente activo adicional. Un componente farmacéuticamente activo a este respecto es un compuesto con un efecto terapéutico para curar, mejorar o evitar una indicación o enfermedad particular como se menciona aquí, preferentemente infecciones por RSV. Estos compuestos incluyen, sin implicar ninguna limitación, péptidos o proteínas, preferentemente como se definen aquí, ácidos nucleicos, preferentemente como se definen aquí, compuestos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular (terapéuticamente activos) (peso molecular inferior a 5000, de preferencia inferior a 1.000),
30 azúcares, antígenos o anticuerpos, preferentemente como se definen aquí, agentes terapéuticos ya conocidos en la técnica anterior, células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares, componentes de la pared celular (por ejemplo polisacáridos), patógenos (virus, bacterias, etc.) modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo químicamente o por irradiación), adyuvantes, preferentemente
35 como se definen aquí, etc. En este contexto se prefieren en particular las vacunas contra el RSV o inmunoglobulinas del RSV, por ejemplo *Palivizumab* (Synagis®).

La composición farmacéutica se puede administrar vía oral, parenteral, por aerosol de inhalación, vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o vía un depósito implantado. El término parenteral como se utiliza aquí incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal,
40 intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intra-arterial y sublingual o técnicas de infusión.

En particular se prefiere la inyección intradérmica e intramuscular. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas inventivas pueden ser suspensiones acuosa u oleosas. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica, utilizando agentes dispersantes
45 o humectantes y agentes de suspensión adecuados.

En una realización preferente, la composición farmacéutica inventiva se administra vía inyección intradérmica o intramuscular, preferentemente empleando técnicas de inyección basadas en agujas convencionales o sistemas sin agujas, por ejemplo inyección por chorro. En una realización preferente
50 adicional, la composición farmacéutica inventiva se puede administrar mediante inyección por chorro como se define aquí. De preferencia, la composición farmacéutica inventiva se puede administrar vía intramuscular mediante inyección por chorro. De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica se administra vía intradérmica por inyección por chorro.

En una realización preferente, la composición farmacéutica se puede administrar una, dos o tres veces, preferentemente por inyección intradérmica o intramuscular, en especial inyección por chorro. De acuerdo
55 con una determinada realización, una única administración de la composición farmacéutica inventiva,

preferentemente por inyección intradérmica o intramuscular, en especial empleando inyección por chorro, es suficiente para producir una respuesta inmune frente al al menos un antígeno codificado por la secuencia de ARNm de acuerdo con la invención. En una realización preferente, la administración única de la composición farmacéutica produce una respuesta inmune que resulta en la neutralización del virus. En este contexto, una inyección intradérmica o intramuscular única de la composición farmacéutica es particularmente preferente. De preferencia, opcionalmente se pueden realizar administraciones adicionales de la composición farmacéutica para mejorar y/o prolongar la respuesta inmunitaria.

De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica inventiva puede comprender un adyuvante. En este contexto, se debe entender un adyuvante como cualquier compuesto adecuado para iniciar o aumentar una respuesta inmune del sistema inmunitario innato, es decir, una respuesta inmune no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición farmacéutica inventiva preferentemente produce una respuesta inmunitaria innata debido al adyuvante opcionalmente contenido en la misma. Preferentemente, este adyuvante se puede seleccionar de un adyuvante conocido por un experto y adecuado para este caso, es decir, que de soporte a la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero, por ejemplo una proteína adyuvante como se definió anteriormente o un adyuvante como se define a continuación.

Adyuvantes particularmente preferentes adecuados para el depósito y el suministro son compuestos catiónicos o policatiónicos como se han definido anteriormente para la secuencia de ARNm inventivo como vehículo, agente de transfección o agente de complejación.

Además, la composición farmacéutica inventiva puede comprender uno o más adyuvantes adicionales, que son adecuados para iniciar o aumentar una respuesta inmune del sistema inmunitario innato, es decir, una respuesta inmunitaria no específica, en particular mediante la unión a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En otras palabras, cuando se administra, la composición farmacéutica o la vacuna preferentemente producen una respuesta inmunitaria innata debido al adyuvante opcionalmente contenido en la misma. De preferencia, este adyuvante se puede seleccionar de un adyuvante conocido por el experto y adecuado para este caso, es decir, que de soporte a la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero, por ejemplo una proteína adyuvante como se ha definido anteriormente o un adyuvante como se define a continuación. De acuerdo con una realización, este adyuvante se puede seleccionar de un adyuvante como se ha definido anteriormente.

Además, dicho adyuvante puede seleccionarse de cualquier adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir, apoyar la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero y/o adecuado para depósito y suministro de los componentes de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna aquí descrita. Son preferentes como adyuvantes adecuados para depósito y suministro los compuestos catiónicos o policatiónicos como se definieron anteriormente. Del mismo modo, el adyuvante puede seleccionarse del grupo consistente en, por ejemplo, compuestos catiónicos o policatiónicos como se definió anteriormente, de quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, plurónicos, solución de alumbre, hidróxido de aluminio, ADJUMERTM (polifosfaceno); gel de fosfato de aluminio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de aluminio (alumbre); gel de hidróxido de aluminio sumamente absorbente de proteínas; gel de hidróxido de aluminio de baja viscosidad; AF o SPT (emulsión de escualeno (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4); AVRIDINETM (propanodiamina); BAY R1005TM ((hidroacetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilaminob-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoilamida); CALCITRIOLTM (1-alfa,25-dihidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de calcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de calcio); holotoxina de cólera, proteína de fusión de cólera toxina-A1-proteína-A-fragmento D, subunidad B de la toxina de cólera; CRL 1005 (copolímero de bloques P1205); liposomas que contienen citoquinas; DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio); DHEA (deshidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complejo de DOC/alumbre (sal de sodio de ácido desoxicólico); adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; inulina-gamma; adyuvante Gerbu (mezcla de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D35 glutamina (GMDP), ii) cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA), iii) complejo de sal de zinc L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF); GMDP (N-acetilglucosaminil-(b14)-N-acetilmuramil-L47-alanil-D-isoglutamina); imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinoline-4-amina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRVs (inmunoliposomas preparados de vesículas de deshidratación-rehidratación); interferón gamma; interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7; interleucina-12; ISCOMS™; ISCOPREP 7.0.3.™; liposomas; LOXORIBINE™ (7-ali-8-oxoguanosina); adyuvante oral LT 5 (enterotoxina-prototoxina lábil de E.coli); microesferas y micropartículas de cualquier composición; MF59TM; (emulsión de agua de escualeno); MONTANIDE™ ISA 51 (adyuvante de Freund incompleto purificado); MONTANIDE ISA 720TM (adyuvante de aceite metabolizable); MPLTM (lípidos A de 3-Q-desacil-4'-monofosforilo); MTP-PE y liposomas MTP-PE ((N-acetil-L alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(hidroxifosforiloxi))-etilamida, sal de monosodio); MURAMETIDE™

- (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURAPALMITINE™ y DMURAPALMITINE™ (Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoilo); NAGO (neuraminidasa-galactosa-oxidasa); nanoesferas o nanopartículas de cualquier composición; NISVs (vesículas de agentes tensioactivos no iónicos); PLEURANTM (β-glucano); PLGA, PGA y PLA (homo- y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico; microesferas/nanoesferas); PLURONIC L121TM; PMMA (polimetilmetacrilato); PODDSTM (microesferas proteínoides); derivados de polietilencarbamato; poli-rA: poli-rU (complejo de ácido poliadenílico-ácido poliuridílico); polisorbato 80 (Tween 80); cocleatos proteínicos (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (saponina de QuilA); S-28463 (4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol); SAF-1TM (“formulación adyuvante Syntex”); proteoliposomas Sendai y matrices lipídicas que contienen Sendai; Span-85 (triolato de sorbitan); Specol (emulsión de Marcol 52, Span 85 y Tween 85); escualeno o Robane™ (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosan y 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexano); esteariltirosina (clorhidrato de octadeciltirosina); Theramid™ (N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Aladipalmitoxipropilamida); Teronil-MDP (Termurtide™ o [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-treonil-D-isoglutamina); partículas de Ty (Ty-VLPs o partículas similares a virus); liposomas Walter-Reed (liposomas que contienen lípido A adsorbido en hidróxido de aluminio), y lipopéptidos, incluyendo Pam3Cys, en particular sales de aluminio, tales como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydralgel; emulsiones, incluyendo CFA, SAF, IFA, MF59, Provax, TiterMax, Montanida, Vaxfectina; copolímeros, incluyendo Optivax (CRL1005), L121, Poloaxmer4010), etc.; liposomas, incluyendo Stealth, cocleatos, incluyendo BIORAL; adyuvantes derivados de plantas, incluyendo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adyuvantes adecuados para la coestimulación incluyendo Tomatina, biopolímeros, incluyendo PLG, PMM, Inulina, adyuvantes derivados de microbios, incluyendo Romurtida, DETOX, MPL, CWS, Manosa, secuencia de ácido nucleicos CpG, CpG7909, ligandos de TLR 1-10 humanos, ligandos de TLR 1-13 de murino, ISS-1018, 35 IC31, Imidazoquinolinas, Ampligen, Ribi529, IMOxine, IRIVs, VLPs, toxina de cólera, toxina lábil térmica, Pam3Cys, Flagelina, anclaje GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusión RSV, cdiGMP; y adyuvantes adecuados como antagonistas incluyendo neuropéptido de CGRP.

Con particular preferencia, un adyuvante puede seleccionarse de adyuvantes que apoyan la inducción de una respuesta inmune a Th1 o la maduración de células T naïve, tales como GM-CSF, IL-12, IFNγ, cualquier ácido nucleico inmunoestimulador como se definió anteriormente, preferiblemente un ARN inmunoestimulador, ADN CpG, etc.

- En una realización preferente adicional, también es posible que la composición farmacéutica inventiva contenga, además del ARNm que proporciona antígenos, componentes adicionales que se seleccionan del grupo consistente en: antígenos adicionales o ácidos nucleicos adicionales que proporcionan antígenos; un agente inmunoterapéutico adicional; una o más sustancias auxiliares; o cualquier compuesto adicional que sea conocido como inmunoestimulador debido a su afinidad de unión (como ligandos) a receptores tipo Toll humanos; y o un ácido nucleico/adyuvante, de preferencia un ARN inmunoestimulador (ARNis).

- La composición farmacéutica inventiva además puede contener una o más sustancias auxiliares para aumentar su inmunogenicidad o su capacidad inmunoestimuladora, si se desea. Preferentemente, con ello se consigue una acción sinérgica de la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí y de una sustancia auxiliar que puede estar contenida opcionalmente en la composición farmacéutica inventiva. Dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, se pueden tomar en consideración diversos mecanismos a este respecto. Por ejemplo, compuestos que permiten la maduración de células dendríticas (DC), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o un ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible utilizar como sustancia auxiliar cualquier agente que influye en el sistema inmunitario en forma de una “señal de peligro” (LPS, GP96, etc.) o citoquinas, tales como GM-CSF, que permiten mejorar y/o influir una respuesta inmunitaria de manera dirigida. Sustancias auxiliares particularmente preferidas son citoquinas, como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, que estimulan adicionalmente la respuesta inmunitaria innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.

Aditivos adicionales que se pueden incluir en la composición farmacéutica inventiva son emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, portadores farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizantes; antioxidantes; conservantes.

- La composición farmacéutica inventiva también puede contener adicionalmente cualquier compuesto adicional, conocido por ser inmunoestimulante debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6,

TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

En este contexto, se prefiere particularmente que el componente adyuvante comprendido opcionalmente comprenda el mismo ARNm inventivo tal como se incluye en la composición farmacéutica inventiva como un ARNm proporcionador de antígenos.

- 5 Además, la composición farmacéutica inventiva puede comprender otros componentes para facilitar la administración y la absorción de los componentes de la composición farmacéutica. Estos componentes adicionales pueden ser un portador o vehículo adecuado, adyuvantes adicionales para ayudar cualquier respuesta inmune, agentes antibacterianos y/o antivirales.

- 10 Así, en una realización adicional, la composición farmacéutica inventiva comprende además un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Este portador farmacéuticamente aceptable incluye típicamente una base líquida o no líquida de una composición que comprende los componentes de la composición farmacéutica inventiva. Si la composición se proporciona en forma líquida, el portador típicamente será agua libre de pirógenos, solución salina isotónica o soluciones tampón (acuosas), por ejemplo soluciones tampón fosfato, citrato, etc. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con respecto al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un mayor, igual o menor contenido en sal con respecto al medio de referencia específico, donde preferentemente se pueden utilizar las concentraciones de sales mencionadas anteriormente que no producen daños celulares debidos a ósmosis u otros efectos de la concentración. Medios de referencia son, por ejemplo, líquidos que se emplean en métodos "*in vivo*", como sangre, linfa, 20 líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o, por ejemplo, líquidos que se pueden utilizar como medios de referencia en métodos "*in vitro*", como tampones o líquidos habituales. Estos tampones o líquidos habituales son conocidos por el experto. Es particularmente preferente como base líquida una solución Ringer-Lactato.

- 25 Sin embargo, también pueden emplearse una o más cargas o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o compuestos encapsulantes, que son adecuados para la administración a un paciente a tratar, para la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. El término "compatible", tal como se usa aquí, significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica inventiva pueden mezclarse con los componentes de la composición farmacéutica inventiva de manera que no se produce una interacción que reduzca esencialmente la eficacia farmacéutica de la composición farmacéutica bajo las condiciones típicas de uso. 30

- Un componente adicional de la composición farmacéutica inventiva puede ser un agente inmunoterapéutico, que puede seleccionarse de inmunoglobulinas, preferiblemente IgG, anticuerpos monoclonales o policlonales, suero o sueros policlonales, etc, preferentemente inmunoglobulinas dirigidas contra el virus respiratorio sincitial (RSV), por ejemplo *Palivizumab*. Preferiblemente, dicho agente inmunoterapéutico 35 adicional puede proporcionarse como un péptido/proteína o puede estar codificado por un ácido nucleico, preferiblemente por un ADN o un ARN, más preferiblemente un ARNm. Este agente inmunoterapéutico permite proporcionar una vacunación pasiva adicional a la vacunación activa activada por los ARNm proporcionadores de antígenos inventivos.

- 40 Además, en una realización específica, además del ARNm para proporcionar antígenos, se pueden incluir antígenos adicionales en la composición farmacéutica inventiva y son típicamente sustancias tales como células, lisados celulares, virus, virus atenuados, virus inactivados, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos u otras bio- o macromoléculas o fragmentos de las mismas. Preferentemente, los antígenos pueden ser proteínas y péptidos o fragmentos de los mismos, tales como epítopos de esas proteínas o péptidos, preferentemente con 5 a 15, con preferencia de 6 a 9 aminoácidos. En particular, las proteínas, péptidos o 45 epítopos se pueden derivar de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa Large L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural del virus respiratorio sincitial (RSV), o a partir de fragmentos, variantes o derivados de los mismos. Además, los antígenos también pueden comprender cualquier otra biomolécula, por ejemplo lípidos, carbohidratos, etc. De preferencia, el 50 antígeno es una proteína o antígeno (poli-)peptídico, un ácido nucleico, un ácido nucleico que codifica para una proteína o antígeno (poli)peptídico, un antígeno polisacárido, un antígeno conjugado polisacárido, un antígeno lipídico, un antígeno glicolípido, un antígeno carbohidrato, una bacteria, una célula (vacuna) o virus muertos o atenuados.

- 55 La composición farmacéutica inventiva o la vacuna como se describe aquí presente puede comprender, además, aditivos o compuestos adicionales. Los aditivos adicionales que se pueden incluir en la

composición farmacéutica son emulsionantes, por ejemplo, Tween®, agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio, agentes colorantes, agentes saborizantes, portadores farmacéuticos, agentes de formación de tabletas, estabilizantes, antioxidantes, conservantes, inhibidores de ARNasa y/o agentes antibacterianos o antivirales. Adicionalmente, la composición farmacéutica inventiva puede comprender un

5 ARN interferente pequeño (ARNsi) dirigido contra los genes del virus respiratorio sincitial (RSV), por ejemplo ARNsi dirigido contra el gen que codifica para la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa Large L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural del virus

10 respiratorio sincitial (RSV). La composición farmacéutica inventiva comprende típicamente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica inventiva, en particular de las secuencias de ARNm inventivas como se definen aquí. Tal como se usa aquí, una "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad de las secuencias de ARNm inventivas como se definen aquí que, como tal,

15 es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno o para evitar una enfermedad, preferentemente las infecciones por RSV como se definen aquí. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" debe ser tan pequeña como para evitar efectos secundarios graves y permitir una relación adecuada entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites típicamente queda dentro del alcance de un juicio médico acertado.

La composición farmacéutica inventiva se puede utilizar para seres humanos y también para fines médicos veterinarios, de preferencia para fines médicos en humanos, como una composición farmacéutica en

20 general o como una vacuna.

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferente, la composición farmacéutica inventiva (o la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí) se puede proporcionar o utilizar como

25 una vacuna. Típicamente, esta vacuna es como se definió anteriormente para las composiciones farmacéuticas. Adicionalmente, esta vacuna contiene típicamente la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí.

La vacuna aquí descrita también puede comprender un portador, un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptables como se define aquí para la composición farmacéutica inventiva. En el

30 contexto específico de la vacuna aquí descrita, la selección de un portador farmacéuticamente aceptable se determina, en principio, por la forma en la cual se administra la vacuna aquí descrita. La vacuna aquí descrita se puede administrar, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías de administración sistémica en general incluyen, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intradérmica e intraperitoneal, y/o vías de administración

35 intranasal. Las vías de administración local en general incluyen, por ejemplo, las vías de administración tópica, aunque también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o inyecciones intramusculares o intralesionales, intracraneales, intrapulmonales, intracardiacas y sublinguales. Con mayor preferencia, las vacunas se pueden administrar vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Así, las vacunas aquí descritas preferentemente se formulan en forma líquida (o a veces en forma sólida).

En una realización preferente, la vacuna aquí descrita se administra vía inyección intradérmica o intramuscular, de preferencia empleando una técnica de inyección basada en aguja convencional o un sistema sin aguja, por ejemplo inyección por chorro. En una realización preferente adicional, la vacuna aquí

40 descrita se puede administrar mediante inyección por chorro como se define aquí. De preferencia, la vacuna aquí descrita se administra vía intramuscular mediante inyección por chorro. De acuerdo con otra realización, la vacuna se administra vía intradérmica por inyección por chorro.

45

En una realización preferente, la vacuna se puede administrar una, dos o tres veces, preferentemente vía inyección intradérmica o intramuscular, de preferencia mediante inyección por chorro. De acuerdo con una determinada realización, una administración única de la vacuna, preferentemente vía inyección intradérmica o intramuscular, de preferencia por inyección por chorro, es suficiente para producir una respuesta

50 inmunitaria frente a al menos un antígeno codificado por la secuencia de ARNm según la invención. En una realización preferente, la única administración de la vacuna produce una respuesta inmunitaria que resulta en la neutralización del virus. En este contexto, es particularmente preferente una sola inyección intradérmica o intramuscular de la vacuna. De preferencia, opcionalmente se pueden llevar a cabo administraciones adicionales de la vacuna para mejorar y/o prolongar la respuesta inmunitaria.

La vacuna aquí descrita puede contener además una o más sustancias auxiliares para aumentar su inmunogenicidad o su capacidad inmunoestimuladora, si se desea. Son particularmente preferentes los

55 adyuvantes como sustancias auxiliares o aditivos como se han definido para la composición farmacéutica.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un kit o kit de partes que comprende la secuencia de ARNm inventiva, la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm como se definen aquí, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita y opcionalmente las instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación de los componentes.

- 5 Además de la secuencia de ARNm inventiva, la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm como se define aquí, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita, el kit puede contener además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un adyuvante y al menos un componente adicional como se define aquí, así como los medios para la administración e instrucciones técnicas. La secuencia de ARNm inventiva, la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna y, por ejemplo, el adyuvante, se pueden proporcionar en forma liofilizada. En una realización preferente, antes de utilizar el kit de vacunación, el vehículo proporcionado es entonces añadido a los componentes liofilizados en una cantidad predeterminada como se describe, por ejemplo, en las instrucciones técnicas proporcionadas. Al hacerlo así, se proporciona la secuencia de ARNm inventiva, la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm como se define aquí, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita de acuerdo con los aspectos de la invención descritos anteriormente, que después se puede utilizar en un método como se ha descrito anteriormente.

- 20 La presente invención proporciona además diversas aplicaciones y usos de la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí, de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm como se define aquí, de la composición farmacéutica inventiva, de la vacuna aquí definida, comprendiendo todos la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí, o de los kits que la comprenden.

- 25 En un aspecto adicional, la invención proporciona una secuencia de ARNm como se define en las reivindicaciones, una composición, una composición farmacéutica, una vacuna y un kit, comprendiendo todos la secuencia de ARNm, para su uso en un método de tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones por RSV. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se dirige al primer uso médico de la secuencia de ARNm inventiva, de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas, de la composición farmacéutica inventiva, de la vacuna aquí descrita y del kit inventivo como se define aquí como un medicamento. En particular, la invención proporciona el uso de una secuencia de ARNm como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento.

- 30 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se dirige al segundo uso médico de la secuencia de ARNm como se define en las reivindicaciones, opcionalmente en forma de una composición que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm como se definen aquí, de una composición farmacéutica o vacuna, o kit o kit de partes para el tratamiento de infecciones por RSV como se define aquí. En particular, la secuencia de ARNm a usar en un método como el anterior es una secuencia de ARNm como se define en las reivindicaciones formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante adicional y opcionalmente un componente adicional como se ha definido anteriormente, por ejemplo un antígeno adicional o una inmunoglobulina de RSV. En este contexto, es particularmente preferente el tratamiento (profiláctico) de lactantes, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. Incluso es especialmente preferente el tratamiento (profiláctico) de lactantes prematuros y lactantes con enfermedad pulmonar crónica.

- 45 La secuencia de ARNm inventivo alternativamente se puede proporcionar de tal forma que es para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones por RSV mediante diversas dosis, cada dosis conteniendo la secuencia de ARNm inventiva como se define en las reivindicaciones, por ejemplo conteniendo la primera dosis al menos un ARNm que codifica un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, y conteniendo la segunda dosis al menos una secuencia de ARNm que codifica para al menos un péptido o proteína antigénicos derivado de un antígeno diferente al del virus respiratorio sincitial (RSV), de preferencia de nucleoproteína N (o fragmentos, variantes o derivados de la misma), de proteína M2-1 o de glucoproteína G (o fragmentos, variantes o derivados de la misma).
- 50 Mediante esta realización, ambas dosis se administran de forma escalonada, es decir, posteriormente, una poco después de la otra, por ejemplo en un intervalo inferior a 10 minutos, preferentemente inferior a 2 minutos, y en el mismo sitio del cuerpo, para alcanzar el mismo efecto inmunológico que el de la administración de una sola composición que contenga ambos, por ejemplo el ARNm que codifica para la proteína de fusión F y el ARNm que codifica para la nucleoproteína N.

- 55 De acuerdo con una realización específica, la secuencia de ARNm inventiva, o la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita, se pueden administrar al paciente como una dosis única. En ciertas realizaciones, la secuencia de ARNm inventiva o la composición farmacéutica inventiva o vacuna aquí

descrita se pueden administrar a un paciente como una dosis única seguida de una segunda dosis más tarde y opcionalmente incluso una tercera, cuarta (o más) dosis posteriores a la misma, etc. De acuerdo con esta realización, se pueden administrar inoculaciones de refuerzo con la secuencia de ARNm inventiva o la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita a un paciente a intervalos de tiempo específicos, de preferencia como se definirá más adelante, después de la segunda (o tercera, cuarta, etc.) inoculación. En este contexto, se prefiere particularmente que las diversas dosis comprendan la misma secuencia de ARNm que codifica para el mismo péptido o proteína antigénicos del virus respiratorio sincitial (RSV), por ejemplo la proteína de fusión F. En esa realización, las dosis se proporcionan en un período de tiempo específico, por ejemplo 20-30 días. Por ejemplo, para una profilaxis posterior a la exposición se pueden administrar en 20-30 días al menos 5 dosis de la secuencia de ARNm inventiva o de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna aquí descrita.

En una realización preferente, la secuencia de ARNm inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita se administra vía inyección intradérmica o intramuscular, de preferencia utilizando una técnica inyección basada en aguja convencional o un sistema sin aguja, por ejemplo inyección por chorro. En una realización preferente adicional, la secuencia de ARNm inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita se pueden administrar mediante inyección por chorro como se define aquí. Preferentemente, la secuencia de ARNm inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita se administran intramuscularmente mediante inyección por chorro. De acuerdo con otra realización, la secuencia de ARNm inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita se administra intradérmicamente vía inyección por chorro.

En una realización preferente, la secuencia de ARNm inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita se puede administrar una, dos o tres veces, de preferencia por inyección intradérmica o intramuscular, en especial mediante inyección por chorro. De acuerdo con una determinada realización, una administración única de la secuencia de ARNm inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna aquí descrita, de preferencia vía inyección intradérmica o intramuscular, de preferencia empleando inyección por chorro, es suficiente para producir una respuesta inmunitaria contra el al menos un antígeno codificado por la secuencia de ARNm según la invención. En una realización preferente, la administración única de la secuencia de ARNm inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna aquí descrita produce una respuesta inmunitaria que da como resultado la neutralización del virus. En este contexto, una sola inyección intradérmica o intramuscular de la secuencia del ARNm inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna aquí descrita es particularmente preferente. De preferencia, se pueden llevar a cabo opcionalmente administraciones adicionales de la secuencia de ARNm inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna aquí descrita para mejorar y/o prolongar la respuesta inmunitaria.

En ciertas realizaciones, estas inoculaciones de refuerzo con la secuencia de ARNm inventiva o con la composición farmacéutica inventiva o con la vacuna aquí descrita pueden utilizar un compuesto adicional o un componente como se define para la secuencia de ARNm inventiva o la composición farmacéutica inventiva o la vacuna aquí descrita como se define aquí.

De acuerdo con un aspecto adicional, se describe aquí un método no reivindicado para la expresión de un péptido o de una proteína antigénica codificada derivada de la proteína de fusión F, la glucoproteína G, la proteína hidrofóbica corta SH, la proteína matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa Large L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína NS1 no estructural o la proteína NS2 no estructural del virus respiratorio sincitial (RSV) que comprende los pasos de, por ejemplo a) proporcionar la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se definen aquí, b) aplicar o administrar la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí a un sistema de expresión, por ejemplo a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), un tejido o un organismo. El método se puede aplicar en laboratorio, para investigación, para el diagnóstico, para la producción comercial de péptidos o proteínas y/o con fines terapéuticos. En este contexto, típicamente, después de preparar la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí, se aplica o administra a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), un tejido o un organismo, por ejemplo, en forma desnuda o complejada o como una composición farmacéutica o vacuna como se describe aquí, preferentemente vía transfección o empleando cualquiera de los modos de administración tal como se describen aquí. El método se puede llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Además, el método se puede llevar a cabo en el contexto del tratamiento de una enfermedad específica, en particular en el tratamiento de enfermedades infecciosas, preferentemente infecciones por RSV como se define aquí.

En este contexto, *in vitro* se define aquí como la transfección o transducción del ARNm inventivo como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí en células cultivadas fuera de un organismo; *in vivo* se define aquí como la transfección o transducción del ARNm inventivo o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas en células mediante la aplicación del ARNm inventivo o de la composición inventiva al organismo completo o individuo y *ex vivo* se define aquí como la transfección o transducción del ARNm inventivo o de la composición de la invención que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas en células fuera de un organismo o individuo y la posterior aplicación de las células transfectadas al organismo o individuo.

- 10 Asimismo, de acuerdo con otro aspecto, la presente descripción también proporciona el uso no reivindicado de la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí, preferentemente con fines diagnósticos o terapéuticos, para la expresión de un péptido o proteína antigénico codificado, por ejemplo aplicando o administrando la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la composición inventiva que
- 15 comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí, por ejemplo, a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), un tejido o un organismo. El uso se puede aplicar en laboratorio, para investigación, para diagnóstico, para la producción comercial de péptidos o proteínas y/o con fines terapéuticos. En este contexto, típicamente después de preparar la secuencia de ARNm inventiva como se define aquí o la
- 20 composición de la invención que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm inventivas como se define aquí, se aplica o administra a un sistema de expresión libre de células, a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), a un tejido o un organismo, preferentemente en forma desnuda o complejada, o como una composición farmacéutica o vacuna como se describe aquí, preferentemente vía transfección o utilizando cualquiera de los modos de administración aquí descritos. El
- 25 uso se puede llevar a cabo *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El uso además se puede llevar a cabo en el contexto del tratamiento de una enfermedad específica, en particular en el tratamiento de infecciones por RSV.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la secuencia de ARNm inventiva, la composición que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm, la composición farmacéutica o el kit o kit de partes que comprende la secuencia de ARNm inventiva para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de

30 infecciones por RSV que comprende los pasos de:

- a) proporcionar la secuencia de ARNm inventiva, la composición que comprende una pluralidad de secuencias de ARNm como se define en las reivindicaciones, la composición farmacéutica o el kit o kit de partes que comprenden la secuencia de ARNm inventiva como se define en las reivindicaciones;
- 35 b) aplicar o administrar la secuencia de ARNm, la composición, la composición farmacéutica o el kit o kit de partes a un tejido o un organismo;
- c) opcionalmente administrar una inmunoglobulina de RSV.

Tomada en conjunto, la presente descripción proporciona, en un cierto aspecto, una secuencia de ARNm que comprende una región codificante como se define en las reivindicaciones. La secuencia de ARNm inventiva es para su uso en un método de tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones provocadas por el virus sincitial (RSV). Por consiguiente, la invención se refiere a una secuencia de ARNm como se define aquí para su uso en un método de tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infecciones por RSV.

40

Breve descripción de las figuras

Las figuras mostradas a continuación son meramente ilustrativas y describen la presente invención de forma adicional. Estas figuras no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

Figura 1: Secuencia de ARNm optimizada en G/C de R1691 que codifica para la proteína F cepa RSV long (RSV-F long) de RSV como está comprendida en la vacuna de ARNm RSV-F long (SEC ID NO: 31).

Figura 2: Secuencia de ARNm optimizada en G/C de R2510 que codifica para la proteína RSV-F de la cepa RSV long (RSV-F long) como está comprendida en la vacuna de ARNm de RSV-F long (SEC ID NO: 32).

Figura 3: Secuencia de ARNm optimizada de G/C de R2821 que codifica para la proteína mutante del554-574 RSV-F de la cepa RSV long (RSV-F log) (SEC ID NO: 33.).

Figura 4: Secuencia de ARNm optimizada en G/C de R2831 que codifica para la proteína RSV-N de la cepa RSV long (RSV-F long) (SEC ID NO: 34).

Figura 5: Secuencia de ARNm optimizada en G/C de R2833 que codifica para la proteína RSV-M₂₋₁ de la cepa RSV long (RSV-F long) (SEC ID NO: 35).

Figura 6: Muestra que la vacuna de ARNm RSV-F long induce títulos de anticuerpos contra la proteína F de RSV comparable con aquella frente a RSV inactivado. Ratones hembra BALB/c fueron inyectados vía intradérmica (i.d.) con la vacuna ARNm RSV-F long (160 µg de R1691) o Ringer-Lactato (tampón RiLa) como tampón control. Un grupo se inyectó intramuscularmente (i.m.) con 10 µg de la vacuna de RSV long inactivado. Todos los animales recibieron inyecciones de refuerzo los días 21 y 35, se recogieron muestras sanguíneas el día 49 para determinar los títulos de anticuerpo en los sueros reunidos como se describe en el Ejemplo 2. Como se puede observar, la vacuna de ARNm del RSV-F long induce anticuerpos anti-proteína-F de las subclases IgG1 y IgG2a. Los títulos de anticuerpos se muestran en la gráfica (n = 5 ratones/grupo).

Figura 7: Muestra que la vacuna ARNm de RSV-F long (R1691) induce una respuesta inmunitaria de larga duración en ratones. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 3 y se determinaron mediante ELISA los títulos totales de anticuerpos IgG. Como se puede observar, los títulos de anticuerpos son estables durante al menos once meses después de la última vacunación de refuerzo.

Figuras 8: Muestra que la vacuna ARNm de RSV-F long (R1691) induce células T CD8⁺ multifuncionales específicas de proteínas de fusión (F) de RSV en ratones. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 4 y se analizaron las células T mediante tinción con citoquina intracelular para la inducción antígeno-específica de citoquinas. Las células se estimularon con un péptido RSV-F (stim. F; KYKNAVTEL) o un péptido control de la influenza HA (stim. HA; IYSTVASSL). La línea en la gráfica representa el valor medio (n = 5 ratones/grupo). Como se puede observar, la vacuna ARNm-F de RSV long induce células T CD8⁺ multifuncionales específicas de proteínas de fusión (F) de RSV, al contrario que la vacuna basada en RSV inactivado, que no fue capaz de inducir células T CD8⁺ específicas de proteína F.

Figura 9: Muestra que la vacuna ARNm de RSV-N (R2831) induce células T CD8⁺ multifuncionales (N)-específicas de nucleoproteína en ratones. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 5 y se analizaron células T mediante tinción con citosina intracelular para la inducción antígeno-específica de citoquinas después de la estimulación con ProMix RSV-N (péptidos 15mer). La línea en la gráfica representa el valor medio (n = 5 ratones/grupo). Como se puede observar, la vacuna de ARNm de RSV-N induce células T CD8⁺ multifuncionales (N)-específicas de la nucleoproteína del RSV, al contrario que la vacuna basada en RSV inactivado, que no fue capaz de inducir células T CD8⁺ específicas de proteínas N.

Figura 10: Muestra que la vacuna de ARNm de RSV-N (R2831) induce células T CD4⁺ multifuncionales (N)-específicas de la nucleoproteína en ratones. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 5 y se analizaron células T mediante tinción con citosina intracelular para la inducción antígeno-específica de citoquinas después de la estimulación con ProMix RSV-N (péptidos 15mer). La línea en la gráfica representa el valor medio (n = 5 ratones/grupo). Como se puede observar, la vacuna de ARNm de RSV-N induce células T CD4⁺ multifuncionales (N)-específicas de la nucleoproteína del RSV, al contrario que la vacuna basada en RSV inactivado, que no es capaz de inducir células T CD4⁺ específicas de proteína N.

Figura 11: Muestra que la vacuna de ARNm de RSV-M₂₋₁ (R2833) induce células T CD8⁺ multifuncionales M₂₋₁-específicas en ratones. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 5 y se analizaron

células T mediante tinción con citocina intracelular para la inducción antígeno-específica de citoquinas después de la estimulación con péptido 9mero de un M₂₋₁ específico. La línea de la gráfica representa el valor medio (n = 5 ratones/grupo). Como puede observar, la vacuna de ARNm de RSV-M₂₋₁ induce células T CD8⁺ multifuncionales RSV-M₂₋₁-específicas de RSV, al contrario que la vacuna basada en RSV inactivado, que no es capaz de inducir células T CD8⁺ específicas de proteínas M₂₋₁.

Figura 12: Muestra que las vacunas de ARNm de RSV-F ya sea solas (RSV-F = R2510; RSV-Fdel554-574 mutante = R2821) o en combinación con ARNm que codifican para otras proteínas de RSV (RSV-N = R2831; RSV-M₂₋₁ = R2833) inducen respuestas inmunitarias humorales en ratas algodóneras. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 6 y se determinaron los títulos de anticuerpos IgG total específico de RSV-F mediante ELISA el día 49. El suero se analizó en dilución diferente, como se muestra abajo en el gráfico.

Figura 13: Muestra que las vacunas de ARNm de RSV-F ya sea solas (RSV-F, R2510; RSV-Fdel554-574 mutante, R2821) o en combinación con ARNm que codifican para otras proteínas de RSV (RSV-N = R2831; RSV-M₂₋₁ = R2833) inducen la formación de anticuerpos funcionales en ratas algodóneras como se muestra en los títulos de anticuerpos de neutralización viral. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 6 y se determinaron mediante análisis de reducción de placas, el día 49, los títulos de neutralización viral.

Figura 14: Muestra que las vacunas de ARNm de RSV-F ya sea solas ((RSV)-F = R2510; RSV-Fdel554-574 mutante = R2821) o en combinación con ARNm que codifican para otras proteínas de RSV (RSV-N = R2831; RSV-M₂₋₁ = R2833) reducen los títulos pulmonares y nasales en ratas algodóneras inoculadas con el virus RSV. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 6. (A) títulos en pulmón el día 5 después de la infección por inoculación de RSV. Todos los grupos de animales vacunados con las vacunas de ARNm mostraron títulos virales por debajo del nivel de detección de la titulación viral realizada, demostrando la protección de las ratas algodóneras vacunadas en términos de títulos pulmonares virales. En comparación con las vacunas de ARNm, la vacuna basada en el virus inactivado con formalina no fue capaz de prevenir los títulos virales en el pulmón. (B) títulos nasales el día 5 después de la infección de inoculación por RSV. El título viral en el tejido nasal no se redujo en gran medida en los grupos vacunados con el ARNm. En comparación con las vacunas de ARNm, la vacuna basada en el virus inactivado con formalina no fue capaz de reducir los títulos del virus nasal.

Figura 15: Muestra los resultados del análisis histopatológico pulmonar del estudio de inoculación de RSV en ratas algodóneras descrito en el Ejemplo 6.

Figura 16: Muestra los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-PCR) de los números de copias de genomas virales (midiendo los números de copias del gen NS-1 de RSV) o las citoquinas expresadas a partir de tejido pulmonar de animales infectados con RSV (o controles) del estudio de inoculación de RSV en ratas algodóneras descrito en el Ejemplo 6.

Figura 17: Muestra que las vacunas de ARNm (RSV-F = R2510; RSV F* (RSV-Fdel554-574 mutante) = R2821) reducen los títulos pulmonares en ratas algodóneras inoculadas con el virus RSV. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 7. (A) títulos en pulmón el día 5 después de la infección por inoculación del RSV. Todos los grupos animales vacunados intradérmicamente con las vacunas de ARNm mostraron títulos virales reducidos en comparación con el grupo control con tampón, que demostró protección de las ratas algodóneras vacunadas en términos de títulos pulmonares virales. Ya una sola dosis de las vacunas de ARNm de RSV-F redujo eficientemente los títulos virales en el pulmón. (B) títulos en pulmón el día 5 después de la infección por inoculación de RSV. El título viral en el pulmón también se redujo en gran medida en los grupos vacunados intramuscularmente con el ARNm.

45 Ejemplos

Los ejemplos mostrados a continuación son simplemente ilustrativos y describen la presente invención de forma adicional. Estos ejemplos no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de la vacuna de ARNm

50 1. Preparación de estructuras de ADN y ARNm

Para estos ejemplos, se prepararon secuencias de ADN que codifican para la proteína F de RSV (R1691 y R2510), la proteína mutante RSV-F del554-574 (R2821), la proteína N de RSV (R2831) y la proteína M2-1 de RSV (R2833) de la cepa RSV long y se utilizaron para posteriores reacciones de transcripción *in vitro*. La proteína mutante RSV-Fdel554-574 se había descrito con anterioridad (Oomens *et al.* 2006. J. Virol. 80(21):10465-77).

De acuerdo con una primera preparación, se prepararon las secuencias de ADN que codifican para los ARNm mencionados anteriormente. La estructura R1691 se preparó modificando la secuencia codificante de tipo silvestre introduciendo una secuencia optimizada en GC para la estabilización, seguida por una secuencia estabilizante derivada de la 3'-UTR de alfa-globina (muag (alfa-globina-3'-UTR mutada) de acuerdo con la SEQ ID NO: 29), un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli(A)), un tramo de 30 citosinas (secuencia poli(c) y un tallo-bucle de histona de acuerdo con la SEQ ID NO: 30. En la SEQ ID NO: 31 (véase la figura 1) se muestra la secuencia de ARNm correspondiente. Las estructuras R2510, R2821, R2831 y R2833 se prepararon introduciendo una 5'-TOP-UTR derivada de la proteína ribosómica 32L de acuerdo con la SEQ ID NO: 23, modificando la secuencia codificante de tipo silvestre introduciendo una secuencia optimizada en GC para la estabilización, seguida por una secuencia estabilizante derivada de la 3'-UTR de albúmina (albumina7 de acuerdo con la SEQ ID NO: 25), un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli(A)), un tramo de 30 citosinas (secuencia poli(C)) y un tallo-bucle de histona de acuerdo con la SEQ ID NO: 30. En las SEQ ID NO: 32-35 (véase la figura 2, 3, 4 y 5) se muestran las secuencias de los ARNm correspondientes.

Tabla 1: Estructuras de ARNm

ARN	Antígeno	Figura	SEQ ID NO.
R1691	RSV F	1	SEQ ID NO. 31
R2510	RSV F	2	SEQ ID NO. 32
R2821	RSV Fdel554-574	3	SEQ ID NO. 33
R2831	RSV N	4	SEQ ID NO. 34
R2833	RSV M ₂₋₁	5	SEQ ID NO. 35

2. Transcripción *In vitro*

Los plásmidos de ADN respectivos preparados de acuerdo con el párrafo 1 se transcribieron *in vitro* utilizando la polimerasa T7 en presencia de un análogo CAP (m⁷GpppG). Posteriormente, el ARNm se purificó utilizando PureMessenger® (CureVac, Tübingen, Alemania; WO2008/077592A1).

3. Reactivos:

Reactivo de complejación: protamina

4. Preparación de la vacuna:

El ARNm se complejó con protamina mediante la adición de protamina al ARNm en proporción (1:2) (p/p) (componente adyuvante). Después de incubar durante 10 minutos, se agregó la misma cantidad del ARNm libre utilizado como ARN para proporcionar antígenos.

Por ejemplo: La vacuna de RSV-F long (R1691): que comprende un componente adyuvante que consiste en el ARNm que codifica para la proteína F de RSV long (R1691) de acuerdo con la SEQ ID NO: 31 complejada con protamina en una proporción 2:1 (p/p) y el ARNm libre que proporciona antígenos que codifica para la proteína F de RSV long (R1691) de acuerdo con la SEQ ID NO: 31 (proporción 1:1; ARN complejo: ARN libre).

Ejemplo 2: Inducción de una respuesta inmunitaria humoral mediante la vacuna del ARNm de RSV-F long en ratones

Inmunización

El día cero, se inyectaron intradérmicamente (i.d.) ratones BALB/c con la vacuna de ARNm de RSV-F long (R1691 de acuerdo con el Ejemplo 1; 25 µg/ratón/día de vacunación) o Ringer-Lactato (RiLa) como tampón control, como se muestra en la Tabla 2. Un grupo control se inyectó intramuscularmente (i.m.) con 10 µg de

la vacuna de RSV long inactivado. El "antígeno del virus respiratorio sincitial" inactivado (RSV long inactivado) se adquirió del INSTITUT VIRION/SERION GmbH-SERION IMMUNDIAGNOSTICA GmbH. El virus inactivado se diluyó en PBS estéril, de forma que se alcanzó una concentración final de 0,2 µg/µl. Todos los animales recibieron inyecciones de refuerzo el día 14 y el día 28. Se recolectaron muestras sanguíneas el día 42 para la determinación de los títulos de anticuerpos anti-RSV F.

5

Tabla 2: Grupos animales

Grupo	Cepa sexo	No. ratones	Ruta volumen	Vacuna dosis	Programa de vacunación
1	BALB/c Hembras	5	i.d. 2x50 µl	R1691 2 µg	d0: principal, d14: refuerzo, d28: refuerzo, d42: recolección de sangre
2	BALB/c Hembras	5	i.m. 2x25 µl	RSV long inactivado 10 µg	d0: principal, d14: refuerzo, d28: refuerzo, d42: recolección de sangre
3	BALB/c Hembras	5	i.d. 2x50 µl	80% tampón ringer-lactato (RiLa)	d0: principal, d14: refuerzo, d28: refuerzo, d42: recolección de sangre

Determinación de los anticuerpos de la proteína anti-RSV F mediante ELISA

- 10 Se recubrieron placas ELISA con la glucoproteína de fusión de RSV humano recombinante (rec.hu-proteína F, conc. final: 5 µg/ml) (Sino Biological Inc.). Las placas recubiertas se incubaron utilizando diluciones séricas determinadas y la unión de anticuerpos específicos a la proteína F se detectó utilizando anticuerpos anti-ratón isotipo específicos biotinilados en combinación con estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) con sustrato ABTS.

Resultados

- 15 Como se puede observar en la figuras 6, la vacuna de ARNm de RSV-F long induce títulos de anticuerpos (IgG total, IgG1 IgG2a) contra la proteína del RSV F comparables con aquellos contra el RSV inactivado.

Ejemplo 3: Inducción de una respuesta inmunitaria humoral duradera mediante la vacuna de ARNm de RSV-F long en ratones

Inmunización

- 20 Ratones BALB/c se inyectaron intradérmicamente (i.d.) con 20 µg de la vacuna de ARNm de RSV-F long (R1691) o tampón RZinger-Lactato (RiLa) de acuerdo con el programa de vacunación mostrado en la Tabla 3. Se recolectó sangre 2 semanas, 4 meses y 11 meses después de la última inmunización.

Tabla 3: Grupos de animales

Grupo	Raza sexo	No. ratones	Ruta Volumen	Vacuna dosis	Programa de vacunación (día)
1	BALB/c Hembra	5	i.d. 100 µl	R1691 20 µg	d0, d14, d28
4	BALB/c Hembra	5	i.d. 100 µl	80% tampón RiLa	d0, d14, d28

Resultados

Como se puede observar en la Figura 7, la vacuna de ARNm de RSV-F long induce una respuesta inmunitaria duradera como se demuestra por los títulos de anticuerpo estables durante al menos 11 meses después de la última vacunación de refuerzo.

- 30 **Ejemplo 4: Inducción de una respuesta inmunitaria celular mediante la vacuna de ARNm del RSV-F long en ratones**

Inmunización

- El día cero, ratones BALB/c se inyectaron intradérmicamente (i.d.) con la vacuna de ARNm del RSV-F long R1691 (20 µg/ratón/día de vacunación) o Ringer-lactato (RiLa) como tampón control como se muestra en la Tabla 4. Un grupo control se inyectó intramuscularmente (i.m.) con 10 µg de la vacuna del RSV long inactivado. El “antígeno del virus respiratorio sincitial” inactivado (RSV long inactivado) se adquirió de INSTITUT VIRION/SERION GmbH-SERION IMMUNDIAGNOSTICA GmbH. El virus inactivado se diluyó en PBS estéril, de forma que se alcanzó una concentración final de 0,2 µg/µl. Todos los animales recibieron inyecciones de refuerzo en los días 14 y 28. Se recolectaron los bazo el día 34 para el análisis de las células T antígeno-específicas.

10

Tabla 4: Grupos animales

Grupo	Raza sexo	No. ratones	Ruta Volumen	Vacuna dosis	Programa de vacunación
1	BALB/c Hembra	5	i.d. 2x 50 µl	R1691 20 µg	d0: principal, d14: refuerzo, d28: refuerzo, d34: recolección de bazo
2	BALB/c Hembra	5	i.m. 2x 25 µl	RSV long inactivado 10 µg	d0: principal, d14: refuerzo, d28: refuerzo, d34: recolección de bazo
3	BALB/c Hembra	5	i.d. 2x 50 µl	Tampon de Lactato de Ringer (RiLa)	d0: principal, d14: refuerzo, d28: refuerzo, d34: recolección de bazo

Tinción intracelular con citoquinas

- Los esplenocitos procedentes de ratones vacunados y control se aislaron de acuerdo con un protocolo estándar. Brevemente, los bazo aislados se trituraron mediante un filtro celular y se lavaron en PBS/1%FBS, seguido por lisis de glóbulos rojos. Después de un paso de lavado a fondo con PBS/1%FBS, los esplenocitos se sembraron en placas de 96 pocillos (2 x 10⁶ células/pocillo). Al siguiente día, las células se estimularon con un péptido RSV-F (KYKNAVTEL; 5 µg/ml; epítipo de células T H-2Kd-reestructuradas) o un péptido control irrelevante derivado de la proteína HA de influenza (YSTVASSL; 5 µg/ml; adquirido de las micro-colecciones EMC) y 2,5 µg/ml de un anticuerpo anti-CD28 (BD Biosciences) durante 6 horas a 37°C, en presencia de la mezcla GolgiPlug^{MR}/GolgiStop^{MR} (inhibidores de transporte de proteínas que contienen Brefeldina A y monensina, respectivamente; BD Biosciences). Después de la estimulación, las células se lavaron y tiñeron para las citoquinas intracelulares utilizando el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la tinción: CD8-PECy7 (1:200), CD3-FITC (1:200), IL2-PerCP-Cy5.5 (1:100), TNFα-PE (1:100), IFNγ-APC (1:100) (eBioscience), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences) y se incubaron con bloque de Fcγ diluido 1:100. Se utilizó Tinte Aqua para distinguir las células vivas/muertas (Invitrogen). Las células se recolectaron utilizando un citómetro de flujo Canto II (Beckton Dickinson). Los datos de la citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). Se realizó un análisis estadístico utilizando el software GraphPad Prism, versión 5.01. Las diferencias estadísticas entre grupos se evaluaron con el test Mann Whitney.

30 *Resultados*

Como se puede observar en la figura 8, la vacuna de ARNm de RSV-F long (R1691) induce células T CD8⁺ multifuncionales IFNγ positivas, TNFα positivas y IFNγ/TNFα doble positivas dirigidas contra la proteína del RSV-F. Sorprendentemente, la vacuna basada en el virus de RSV inactivado no fue capaz de inducir células T CD8⁺ antígeno-específicas.

35 **Ejemplo 5: Inducción de respuestas inmunitarias celulares mediante las vacunas de ARNm de RSV-N y RSV-M₂₋₁ en ratones***Inmunización*

- El día cero, ratones BALB/c se inyectaron intradérmicamente (i.d.) con diferentes dosis de la vacuna ARNm R2831 de RSV-N, la vacuna ARNm R2833 de RSV-M₂₋₁ o Ringer-Lactato (RiLa) como tampón control como se muestra en la Tabla 5. Un grupo control se inyectó intramuscularmente (i.m.) con 10 µg de la vacuna del

RSV long inactivado. El "Antígeno del virus respiratorio sincitial" inactivado (RSV long inactivado) se adquirió del INSTITUT VIRION/SERION GmbH-SERION IMMUNDIAGNOSTICA GmbH. El virus inactivado se diluyó en PBS estéril, de tal forma que se alcanzó una concentración final de 0,2 µg/µL. Todos los animales recibieron inyecciones de refuerzo en los días 7 y 21. Los bazos se recolectaron en el día 27 para el análisis de las células T antígeno-específicas.

5

Tabla 5: Grupos de animales

Grupo	Raza sexo	No. ratones	Ruta Volumen	Vacuna dosis	Programa de vacunación
1	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x 50 µl	R2831 RSV-N 40 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
2	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x 25 µl	R2831 RSV-N 20 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
3	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x12.5 µl	R2831 RSV-N 10 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
4	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x 50 µl	R2833 RSV-M ₂₋₁ 40 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
5	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x 25 µl	R2833 RSV-M ₂₋₁ 20 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
6	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x12,5 µl	R2833 RSV-M ₂₋₁ 10 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
7	BALB/c Hembra	5	i.m. 2x 25 µl	RSV long Inactiv. 10 µg	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos
8	BALB/c Hembra	5	i.d. 1x 50 µl	100% de tampon de RiLa	d0: principal, d7: refuerzo, d21: refuerzo, d27: recolección de bazos

Se realizó una tinción con citoquina intracelular como se describe en el Ejemplo 4, excepto que las células se trataron con los siguientes estimuladores: péptido M2-1 (5 µg/ml) Grupo 4 a 8; (SYIGSINNI de ProImmune); ProMix N (1 µg/ml) 1-3, grupo 7 y 8; (PX39 de ProImmune); Control: medio + DMSO + anti-CD28, el grupo 1-8 como se describió anteriormente.

10

Resultados

Como se puede observar en la figura 9, la vacuna de ARNm de RSV-N (R2831) induce células T CD8⁺ multifuncionales IFNγ positivas, TNFα positivas e IFNγ-TNFα doble positivas dirigidas contra la proteína del RSV-N en ratones. Sorprendentemente, la vacuna basada en el virus RSV inactivado no fue capaz de inducir células T CD8⁺ antígeno específicas.

15

Como se puede en la figura 10, la vacuna de ARNm de RSV-N (R2831) induce células T CD4⁺ multifuncionales IFNγ positivas, TNFα positivas e IFNγ-TNFα doble positivas dirigidas contra la proteína del RSV-N en ratones. Sorprendentemente, la vacuna basada en el virus RSV inactivado no fue capaz de inducir células T CD4⁺ antígeno específicas.

20

Como se puede observar en la figura 11, la vacuna ARNm del RSV-M₂₋₁ (R2833) induce células T CD8⁺ multifuncionales IFNγ positivas, TNFα positivas e IFNγ-TNFα doble positivas dirigidas contra la proteína del RSV M₂₋₁ en ratones. Sorprendentemente, la vacuna basada en el virus RSV inactivado no fue capaz de inducir células T CD8⁺ antígeno específicas.

25 Ejemplo 6: Estudio 1 de inoculación de RSV en ratas algodonerías

Para el desarrollo de las vacunas del RSV, la rata algodonería es un modelo animal aceptado, en especial para la infección por inoculación. Las ratas algodonerías responden a las preparaciones de la vacuna del virus del RSV inactivado con formalina con patología pulmonar mejorada. Esto permite evaluar la seguridad de una vacuna en los términos de un fenómeno de enfermedad mejorada.

30 Para ampliar y optimizar la respuesta inmunitaria RSV específica, se prepararon vacunas del ARNm que codifican para diferentes proteínas de RSV (RSV F, mutante RSV-Fdel554-574, N y M₂₋₁) de acuerdo con

- el Ejemplo 1. Para evaluar el efecto de vacunas individuales o combinadas, estas vacunas se administraron ya sea solas o en combinación (cóctel de vacunas) como se muestra en la Tabla 5. Los volúmenes de vacuna de 2x50 µl se inyectaron intradérmicamente (i.d.) en la piel de la espalda de las ratas algodonerías. Grupos adicionales se inmunizaron intramuscularmente (i.m.) con RSV inactivado con β-propiolactona (INSTITUT VIRION/SERION GmbH-SERION IMMUNDIAGNOSTICA GmbH), RSV inactivado con formalina (Sigmovir) o RSV/A2 vivo (Sigmovir) (10⁵ unidades formadoras de placa, ufp) para comparar su inmunogenicidad con las vacunas de ARNm. Otros grupo recibieron inyecciones i.m. del anticuerpo anti-RSV monoclonal SYNAGIS® (palivizumab) como inmunización pasiva. SYNAGIS® se administró con una dosis de 15 mg/kg en el día antes de la infección por inoculación de RSV. Así, los animales se pesaron y se calculó la cantidad adecuada de SYNAGIS® de acuerdo con el peso del animal. El volumen máximo para la inyección i.m. fue 200 µl por rata de 100 g. Después de la inmunización las ratas algodonerías se inocularon por infección intranasal (i.n.) con el virus de RSV/A2 (10⁵ UFP en 100 µl; Sigmovir).

Tabla 5: Grupos animales

Grupo	vacuna dosis	Vol.	Antígeno	Ruta	# admin.	N por grupo	Vacunación (día)	Sangre (día)
A	RSV inactivado con β-propiolactona 20 µg	100 µl	--	IM	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
B	R2510 80 µg	2x50 µl	RSV F	ID	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
C	R2821 80 µg	2x50 µl	RSV F mutante	ID	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
D	R2510 + R2831 "cóctel I" cada uno 40 µg	2x50 µl	RSV F+ RSV N	ID	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
E	R2510 + R2833 "cóctel II" cada uno 40 µg	2x50 µl	RSV F+ RSV M ₂₋₁	ID	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
F	R2510+ R2831+R2833 "cóctel III" cada uno 26.666 µg	2x50 µl	RSV F+ RSV M ₂₋₁ + RSV N	ID	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
G	RiLa	2x50 µl	--	ID	3	5	0, 14, 28	14, 28, 49
H	FI-RSV Lote #100 (diluido 1:100 en PBS)	100 µl	--	IM	2	5	0, 28	28, 49
I	RSV/A2 vivo 10 ⁵ ufp	100 µl	--	IM	1	5	0	49
J	SYNAGIS® (15 mg/kg)		--	IM	1	5	48	49
K	Control Neg.		--	N/A	N/A	5	--	--

- Se realizaron los siguientes ensayos para analizar las respuestas inmunitarias: ELISA IgG en suero con la proteína del RSV F, títulos de anticuerpo neutralizante del virus RSV (VNT), titulaciones virales del RSV e histopatología pulmonar.

ELISA IgG en suero de RSV-F

- La inducción de anticuerpos de la proteína anti-RSV F se determinaron mediante ELISA de acuerdo con el Ejemplo 2.

Títulos del anticuerpo neutralizante del virus RSV (VNT)

- Se analizaron sueros mediante la prueba de neutralización del virus (VNT). Brevemente, las muestras de suero se diluyeron 1:10 con EMEM, se inactivaron con calor y además se diluyeron en series 1:4. Las muestras de suero diluido se incubaron con RSV (25-50 UFP) durante 1 hora a temperatura ambiente y se inocularon por duplicado en monocapas de HEp-2 confluentes en placas de 24 pocillos. Después de una hora de incubación a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%, los pocillos se recubrieron con medio de metilcelulosa al 0,75%. Después de 4 días de incubación, el recubrimiento se retiró y las células se fijaron con tinción de cristal violeta al 0,1% durante una hora y luego se enjuagaron y secaron con aire. Los títulos del anticuerpo neutralizante recíproco correspondientes se determinaron al límite de reducción del 60% del control.

Titulaciones virales del RSV e histopatología pulmonar

El día 54, se recolectó el tejido nasal y se homogeneizó para las titulaciones virales. El pulmón se recolectó en bloque y se tri-seccionó para titulación viral (sección izquierda), histopatología (sección derecha) y

análisis PCR (lóbulo lingular). Además, se determinaron los números de copias del genoma viral del RSV (midiendo los números de copias del gen NS-1 del RSV) y los niveles de ARNm de citocina mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR).

Resultados

- 5 Como se puede observar en la figura 12, las vacunas de ARNm del RSV-F ya sea solas (RSV-F = R2510; RSV-Fdel554-574 mutante = R2821) o en combinación con los ARNm que codifican para otras proteínas del RSV (RSV-N = R2831; RSV M2-1 = R2833), inducen respuestas inmunitarias humorales específicas de RSV-F en ratas algodóneras como se demuestra por los títulos totales del anticuerpos IgG el día 49.
- 10 Como se puede observar en la figura 13, las vacunas de ARNm del RSV-F ya sea solas (RSV-F = R2510; RSV-Fdel554-574 mutante = R2821) o en combinación con los ARNm que codifican para otras proteínas de RSV (RSV-N, R2831 = RSV -M2-1 = R2833), inducen la formación de anticuerpos funcionales RSV específicos en ratas algodóneras como se demuestra por los títulos de anticuerpos neutralizantes del virus.
- 15 Como se puede observar en la figura 14, las vacunas de ARNm del RSV-F ya sea solas (RSV-F = R2510; RSV-Fdel554-574 mutante = R2821) o en combinación con los ARNm que codifican para otras proteínas del RSV (RSV-N = R2831; RSV M2-1 = R2833) reducen los títulos virales de pulmón y nasales en ratas algodóneras inoculadas con el virus RSV.
- 20 Como se puede observar en la figura 14A, todos los grupos animales vacunados con las vacunas de ARNm mostraron títulos de virus por debajo del nivel de detección de la titulación del virus realizada, demostrando la protección de las ratas algodóneras vacunadas en términos de títulos pulmonares virales. Por el contrario, la vacuna del virus inactivado con formalina redujo sólo al mínimo el título del virus pulmonar en comparación con el grupo control con tampón RiLa. El efecto de la vacuna del RSV inactivado con β -propiolactona fue más pronunciado, pero no redujo el título pulmonar del virus por debajo del nivel de detección en todos los animales de este grupo. Como se puede observar en la figura 14B, el título viral en el tejido nasal también se redujo en gran medida en los grupos vacunados con el ARNm. Los títulos virales nasales del virus inactivado con formalina fueron comparables con el título viral en el grupo vacunado con RiLa. La vacuna del virus inactivado con β -propiolactona fue más efectiva (al menos para dos de los cinco animales). Por el contrario, todos los grupos vacunados con el ARNm tuvieron un título reducido del virus nasal en comparación con el grupo vacunado con RiLa.
- 25 Como se puede observar en la Figura 15, el análisis de histopatología pulmonar a partir del estudio de inoculación de ratas algodóneras con el RSV revela diferentes marcas de patología para diversos grupos animales. A partir de la histopatología se puede concluir que ninguno de los grupos vacunados con el ARNm exhibieron una patología pulmonar mejorada, como es el caso para el grupo que se vacunó utilizando la vacuna de RSV inactivado con formalina. Las marcas de patología promedio para peribronquiolitis (PB), perivascularitis (PV), neumonía intersticial (IP) y alveolitis (A) son mucho menores para todos los grupos vacunados con el ARNm en comparación con el grupo H (RSV inactivado con formalina). Además, los grupos que serán vacunados con R2510 (grupo B; RSV F) o R2821 (grupo C; mutante del RSV F) parecen exhibir una patología pulmonar reducida en comparación con el grupo (G) vacunado con el tampón RiLa y el grupo infectado posteriormente con el RSV.
- 30 Como se puede observar en la figura 16, la RT-PCR cuantitativa revela diferentes patrones de expresión para los diversos grupos animales. La cuantificación de las copias del genoma del RSV al medir el gen NS-1 del RSV se muestra en A. los número de copias del genoma se reduce por la vacunación utilizando las vacunas de ARNm en comparación con el control con tampón RiLa (grupo G). Este no es el caso para el grupo que se vacunó utilizando el RSV inactivado con formalina (grupo H). Como se observa en B, la vacunación utilizando la vacuna del RSV inactivado con formalina (grupo H) induce una expresión mejorada de la citoquina IL-4 de TH2 en comparación con el grupo control, que se vacunó con el tampón RiLa (grupo G). Por el contrario, la vacunación con el ARNm R2821 que codifica para el mutante RSV-F reduce significativamente la expresión de ARNm IL-4 en comparación con el grupo control con RiLa en el pulmón después de la infección por inoculación del RSV. C. Expresión del ARNm de INF- γ . D. Expresión de ARNm de IL-5. La expresión de IL-5 se reduce significativamente en los grupos vacunados utilizando R2510 o
- 35 R2821 en comparación con los animales vacunados con el tampón RiLa. La expresión ARN de NS-1 viral o los ARNm de citocinas, que se aislaron del tejido pulmonar, se mide en el días 5 después de la inoculación. El análisis estadístico se realizó con la prueba T de Student (* p <0,05 en comparación con el grupo G (control RiLa)).
- 40
- 45
- 50

Ejemplo 7: Estudio II de inoculación de ratas algodóneras RSV

- Las vacunas de ARNm que codifican para la proteína (F) de RSV F o la proteína (F*) de RSV-F mutante (RSV F del554-574) se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1. Para evaluar el efecto de una sola o varias vacunaciones (vacunaciones principal y de refuerzo), estas vacunas se administraron una, dos o 3 veces (como se muestra en la Tabla 6). Los volúmenes de vacunas de 2x50 µl se inyectaron intradérmicamente (i.d.) en la piel de la espalda de ratas de algodóneras. Se inmunizaron intramuscularmente (i.m.) grupos adicionales con volúmenes de vacuna de 1 x 100 µl en la pata trasera derecha. Como control, un grupo se inyectó intradérmicamente con tampón de Lactato de Ringer (tampón). Después de la inmunización, las ratas algodóneras se inocularon mediante infección intranasal (i.n.) con el virus RSV/A2 (105 UFP en 100 µl; Sigmovir). Como control, un grupo no se trató y permaneció sin inocular con el virus (no tratado).

Tabla 5: Grupos de animales

Grupos	Vacuna dosis	Volumen	Antígeno	Ruta	# de adm.	N por grupo	Vac. (día)	Inoculación (día)
F* i.d. 3x	R2821 80 µg	2x50 µl	RSV F mutante	ID	3	5	0, 14, 28	49
F* i.d. 2x	R2821 80 µg	2x50 µl	RSV F mutante	ID	2	5	0, 14	49
F* i.d. 1x	R2821 80 µg	2x50 µl	RSV F mutante	ID	1	5	0	49
F i.d. 3x	R2510 80 µg	2x50 µl	RSV F	ID	3	5	0, 14, 28	49
F i.d. 2x	R2510 80 µg	2x50 µl	RSV F	ID	2	5	0, 14	49
F i.d. 1x	R2510 80 µg	2x50 µl	RSV F	ID	1	5	0	49
F* i.m.	R2821 80 µg	1x100 µl	RSV F mutante	IM	2	5	0, 14	49
F i.m.	R2510 80 µg	1x100 µl	RSV F	IM	2	5	0, 14	49
Tampón	-	2x50 µl		ID	3	5	0, 14, 28	49
Sin tratar	-		--	N/A	N/A	5	--	--

Valoraciones virales del RSV

La determinación de los títulos virales del RSV se realizó como se describe en el Ejemplo 6.

Resultados

- 15 Como se muestra en la figura 17A, ya una sola vacunación intradérmica con las vacunas de ARNm que codifican para la proteína F del RSV (F) o la proteína (F*) del RSV-F mutante (RSV F del554-574) fue bastante eficiente para reducir el título viral en el pulmón en comparación con el grupo con control de tampón. Una segunda y una tercera vacunación (vacunaciones de refuerzo) redujeron los títulos virales por debajo del nivel de detección.
- 20 Como se muestra en la figura 17B, dos vacunaciones intramusculares con las vacunas de ARNm que codifican para la proteína (F) del RSVF o la proteína (F*) del RSV-F mutante (RSV F del554-574) redujeron en gran medida el título viral en el pulmón en comparación con el grupo con control de tampón.

Listado de secuencias

<110> CureVac GmbH

<120> Vacuna del virus respiratorio sincitial (RSV)

<130> CU01P151WO1

5 <160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

10 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 1

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Asn
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Thr Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

ES 2 747 762 T3

Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val
			180					185						190	
Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn
		195					200					205			
Lys	Gln	Ser	Cys	Arg	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln
	210					215					220				
Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn
225					230					235					240
Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu
				245					250					255	
Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys
			260					265					270		
Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile
		275					280					285			
Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro
	290					295					300				
Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro
305					310					315					320
Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg
				325					330					335	
Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe
			340					345					350		

ES 2 747 762 T3

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 2

<211> 298

5 <212> PRT

<213> virus respiratorio sincitial

<400> 2

ES 2 747 762 T3

Met	Ser	Lys	Asn	Lys	Asp	Gln	Arg	Thr	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	Lys	Thr
1				5					10					15	
Trp	Asp	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Lys
			20					25					30		
Leu	Asn	Leu	Lys	Ser	Ile	Ala	Gln	Ile	Thr	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala	Met
		35					40					45			
Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Leu	Ile	Ile	Thr	Ala	Ile	Ile	Phe	Ile	Ala	Ser
	50					55					60				
Ala	Asn	His	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Ala	Ile	Ile	Gln	Asp	Ala	Thr
65					70				75					80	
Ser	Gln	Ile	Lys	Asn	Thr	Thr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Gln
				85					90					95	
Leu	Gly	Ile	Ser	Phe	Ser	Asn	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Gln	Thr	Thr
			100					105					110		
Thr	Ile	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro
		115					120					125			
Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Lys	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	Gln	Pro	Ser
	130					135					140				
Lys	Pro	Thr	Thr	Lys	Gln	Arg	Gln	Asn	Lys	Pro	Pro	Asn	Lys	Pro	Asn
145					150					155					160

ES 2 747 762 T3

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Thr Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

Lys Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260 265 270

Asn Leu Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu His Pro Ser Gln
275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Thr Arg Gln
290 295

<210> 3

<211> 64

<212> PRT

5 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 3

Met Glu Asn Thr Ser Ile Thr Ile Glu Phe Ser Ser Lys Phe Trp Pro
1 5 10 15

Tyr Phe Thr Leu Ile His Met Ile Thr Thr Ile Ile Ser Leu Leu Ile
20 25 30

Ile Ile Ser Ile Met Thr Ala Ile Leu Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn
35 40 45

Val Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr
50 55 60

<210> 4

10 <211> 256

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincitial

<400> 4

ES 2 747 762 T3

Met Glu Thr Tyr Val Asn Lys Leu His Glu Gly Ser Thr Tyr Thr Ala
1 5 10 15

Ala Val Gln Tyr Asn Val Leu Glu Lys Asp Asp Asp Pro Ala Ser Leu
20 25 30

Thr Ile Trp Val Pro Met Phe Gln Ser Ser Met Pro Ala Asp Leu Leu
35 40 45

Ile Lys Glu Leu Ala Asn Val Asn Ile Leu Val Lys Gln Ile Ser Thr
50 55 60

Pro Lys Gly Pro Ser Leu Arg Val Met Ile Asn Ser Arg Ser Ala Leu
65 70 75 80

Leu Ala Gln Met Pro Ser Lys Phe Thr Ile Cys Ala Asn Val Ser Leu
85 90 95

Asp Glu Arg Ser Lys Leu Ala Tyr Asp Val Thr Thr Pro Cys Glu Ile
100 105 110

Lys Ala Cys Ser Leu Thr Cys Leu Lys Ser Lys Asn Met Leu Thr Thr
115 120 125

Val Lys Asp Leu Thr Met Lys Thr Leu Asn Pro Thr His Asp Ile Ile
130 135 140

Ala Leu Cys Glu Phe Glu Asn Ile Val Thr Ser Lys Lys Val Ile Ile
145 150 155 160

Pro Thr Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Val Arg Asn Lys Asp Leu Asn Thr
165 170 175

Leu Glu Asn Ile Thr Thr Thr Glu Phe Lys Asn Ala Ile Thr Asn Ala
180 185 190

Lys Ile Ile Pro Tyr Ser Gly Leu Leu Leu Val Ile Thr Val Thr Asp
195 200 205

Asn Lys Gly Ala Phe Lys Tyr Ile Lys Pro Gln Ser Gln Phe Ile Val
210 215 220

Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Glu Lys Glu Ser Ile Tyr Tyr Val Thr Thr
225 230 235 240

Asn Trp Lys His Thr Ala Thr Arg Phe Ala Ile Lys Pro Met Glu Asp
245 250 255

<210> 5

5 <211> 391

ES 2 747 762 T3

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincitial

<400> 5

```

Met Ala Leu Ser Lys Val Lys Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Asp Gln
1          5          10          15

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser
          20          25          30

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys
          35          40          45

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu
50          55          60

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
65          70          75          80
5

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp
          85          90          95

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu
          100          105          110

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu
          115          120          125

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu
          130          135          140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile
          145          150          155          160

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
          165          170          175

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn
          180          185          190

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser
          195          200          205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val
          210          215          220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
          225          230          235          240

```

ES 2 747 762 T3

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
385 390

- 5 <210> 6
<211> 2165
<212> PRT
<213> virus respiratorio sincitial

<400> 6

Met Asp Pro Ile Ile Asn Gly Asn Ser Ala Asn Val Tyr Leu Thr Asp
1 5 10 15

Ser Tyr Leu Lys Gly Val Ile Ser Phe Ser Glu Cys Asn Ala Leu Gly
20 25 30

Ser Tyr Ile Phe Asn Gly Pro Tyr Leu Lys Asn Asp Tyr Thr Asn Leu
35 40 45

10 Ile Ser Arg Gln Asn Pro Leu Ile Glu His Met Asn Leu Lys Lys Leu
50 55 60

ES 2 747 762 T3

Asn Ile Thr Gln Ser Leu Ile Ser Lys Tyr His Lys Gly Glu Ile Lys
65 70 75 80

Leu Glu Glu Pro Thr Tyr Phe Gln Ser Leu Leu Met Thr Tyr Lys Ser
85 90 95

Met Thr Ser Leu Glu Gln Ile Ala Thr Thr Asn Leu Leu Lys Lys Ile
100 105 110

Ile Arg Arg Ala Ile Glu Ile Ser Asp Val Lys Val Tyr Ala Ile Leu
115 120 125

Asn Lys Leu Gly Leu Lys Glu Lys Asp Lys Ile Lys Ser Asn Asn Gly
130 135 140

Gln Asp Glu Asp Asn Ser Val Ile Thr Thr Ile Ile Lys Asp Asp Ile
145 150 155 160

Leu Ser Ala Val Lys Asp Asn Gln Ser His Leu Lys Ala Asp Lys Asn
165 170 175

His Ser Thr Lys Gln Lys Asp Thr Ile Lys Thr Thr Leu Leu Lys Lys
180 185 190

Leu Met Cys Ser Met Gln His Pro Pro Ser Trp Leu Ile His Trp Phe
195 200 205

Asn Leu Tyr Thr Lys Leu Asn Asn Ile Leu Thr Gln Tyr Arg Ser Asn
210 215 220

Glu Val Lys Asn His Gly Phe Ile Leu Ile Asp Asn Gln Thr Leu Ser
225 230 235 240

Gly Phe Gln Phe Ile Leu Asn Gln Tyr Gly Cys Ile Val Tyr His Lys
245 250 255

Glu Leu Lys Arg Ile Thr Val Thr Thr Tyr Asn Gln Phe Leu Thr Trp
260 265 270

ES 2 747 762 T3

Lys Asp Ile Ser Leu Ser Arg Leu Asn Val Cys Leu Ile Thr Trp Ile
275 280 285

Ser Asn Cys Leu Asn Thr Leu Asn Lys Ser Leu Gly Leu Arg Cys Gly
290 295 300

Phe Asn Asn Val Ile Leu Thr Gln Leu Phe Leu Tyr Gly Asp Cys Ile
305 310 315 320

Leu Lys Leu Phe His Asn Glu Gly Phe Tyr Ile Ile Lys Glu Val Glu
325 330 335

Gly Phe Ile Met Ser Leu Ile Leu Asn Ile Thr Glu Glu Asp Gln Phe
340 345 350

Arg Lys Arg Phe Tyr Asn Ser Met Leu Asn Asn Ile Thr Asp Ala Ala
355 360 365

Asn Lys Ala Gln Lys Asn Leu Leu Ser Arg Val Cys His Thr Leu Leu
370 375 380

Asp Lys Thr Val Ser Asp Asn Ile Ile Asn Gly Arg Trp Ile Ile Leu
385 390 395 400

Leu Ser Lys Phe Leu Lys Leu Ile Lys Leu Ala Gly Asp Asn Asn Leu
405 410 415

Asn Asn Leu Ser Glu Leu Tyr Phe Leu Phe Arg Ile Phe Gly His Pro
420 425 430

Met Val Asp Glu Arg Gln Ala Met Asp Ala Val Lys Val Asn Cys Asn
435 440 445

Glu Thr Lys Phe Tyr Leu Leu Ser Ser Leu Ser Met Leu Arg Gly Ala
450 455 460

Phe Ile Tyr Arg Ile Ile Lys Gly Phe Val Asn Asn Tyr Asn Arg Trp
465 470 475 480

ES 2 747 762 T3

Pro Thr Leu Arg Asn Ala Ile Val Leu Pro Leu Arg Trp Leu Thr Tyr
485 490 495

Tyr Lys Leu Asn Thr Tyr Pro Ser Leu Leu Glu Leu Thr Glu Arg Asp
500 505 510

Leu Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Tyr Arg Glu Phe Arg Leu Pro
515 520 525

Lys Lys Val Asp Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Lys Ala Ile Ser Pro
530 535 540

Pro Lys Asn Leu Ile Trp Thr Ser Phe Pro Arg Asn Tyr Met Pro Ser
545 550 555 560

His Ile Gln Asn Tyr Ile Glu His Glu Lys Leu Lys Phe Ser Glu Ser
565 570 575

Asp Lys Ser Arg Arg Val Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg Asp Asn Lys Phe
580 585 590

Asn Glu Cys Asp Leu Tyr Asn Cys Val Val Asn Gln Ser Tyr Leu Asn
595 600 605

Asn Pro Asn His Val Val Ser Leu Thr Gly Lys Glu Arg Glu Leu Ser
610 615 620

Val Gly Arg Met Phe Ala Met Gln Pro Gly Met Phe Arg Gln Val Gln
625 630 635 640

Ile Leu Ala Glu Lys Met Ile Ala Glu Asn Ile Leu Gln Phe Phe Pro
645 650 655

Glu Ser Leu Thr Arg Tyr Gly Asp Leu Glu Leu Gln Lys Ile Leu Glu
660 665 670

Leu Lys Ala Gly Ile Ser Asn Lys Ser Asn Arg Tyr Asn Asp Asn Tyr
675 680 685

ES 2 747 762 T3

Asn Asn Tyr Ile Ser Lys Cys Ser Ile Ile Thr Asp Leu Ser Lys Phe
690 695 700

Asn Gln Ala Phe Arg Tyr Glu Thr Ser Cys Ile Cys Ser Asp Val Leu
705 710 715 720

Asp Glu Leu His Gly Val Gln Ser Leu Phe Ser Trp Leu His Leu Thr
725 730 735

Ile Pro His Val Thr Ile Ile Cys Thr Tyr Arg His Ala Pro Pro Tyr
740 745 750

Ile Arg Asp His Ile Val Asp Leu Asn Asn Val Asp Glu Gln Ser Gly
755 760 765

Leu Tyr Arg Tyr His Met Gly Gly Ile Glu Gly Trp Cys Gln Lys Leu
770 775 780

Trp Thr Ile Glu Ala Ile Ser Leu Leu Asp Leu Ile Ser Leu Lys Gly
785 790 795 800

Lys Phe Ser Ile Thr Ala Leu Ile Asn Gly Asp Asn Gln Ser Ile Asp
805 810 815

Ile Ser Lys Pro Val Arg Leu Met Glu Gly Gln Thr His Ala Gln Ala
820 825 830

Asp Tyr Leu Leu Ala Leu Asn Ser Leu Lys Leu Leu Tyr Lys Glu Tyr
835 840 845

Ala Gly Ile Gly His Lys Leu Lys Gly Thr Glu Thr Tyr Ile Ser Arg
850 855 860

Asp Met Gln Phe Met Ser Lys Thr Ile Gln His Asn Gly Val Tyr Tyr
865 870 875 880

Pro Ala Ser Ile Lys Lys Val Leu Arg Val Gly Pro Trp Ile Asn Thr
885 890 895

ES 2 747 762 T3

Ile Leu Asp Asp Phe Lys Val Ser Leu Glu Ser Ile Gly Ser Leu Thr
 900 905 910
 Gln Glu Leu Glu Tyr Arg Gly Glu Ser Leu Leu Cys Ser Leu Ile Phe
 915 920 925
 Arg Asn Val Trp Leu Tyr Asn Gln Ile Ala Leu Gln Leu Lys Asn His
 930 935 940
 Ala Leu Cys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Asp Ile Leu Lys Val Leu Lys
 945 950 955 960
 His Leu Lys Thr Phe Phe Asn Leu Asp Asn Ile Asp Thr Ala Leu Thr
 965 970 975
 Leu Tyr Met Asn Leu Pro Met Leu Phe Gly Gly Gly Asp Pro Asn Leu
 980 985 990
 Leu Tyr Arg Ser Phe Tyr Arg Arg Thr Pro Asp Phe Leu Thr Glu Ala
 995 1000 1005
 Ile Val His Ser Val Phe Ile Leu Ser Tyr Tyr Thr Asn His Asp
 1010 1015 1020
 Leu Lys Asp Lys Leu Gln Asp Leu Ser Asp Asp Arg Leu Asn Lys
 1025 1030 1035
 Phe Leu Thr Cys Ile Ile Thr Phe Asp Lys Asn Pro Asn Ala Glu
 1040 1045 1050
 Phe Val Thr Leu Met Arg Asp Pro Gln Ala Leu Gly Ser Glu Arg
 1055 1060 1065
 Gln Ala Lys Ile Thr Ser Glu Ile Asn Arg Leu Ala Val Thr Glu
 1070 1075 1080
 Val Leu Ser Thr Ala Pro Asn Lys Ile Phe Ser Lys Ser Ala Gln
 1085 1090 1095

ES 2 747 762 T3

His Tyr Thr Thr Thr Glu Ile Asp Leu Asn Asp Ile Met Gln Asn 1100 1105 1110
Ile Glu Pro Thr Tyr Pro His Gly Leu Arg Val Val Tyr Glu Ser 1115 1120 1125
Leu Pro Phe Tyr Lys Ala Glu Lys Ile Val Asn Leu Ile Ser Gly 1130 1135 1140
Thr Lys Ser Ile Thr Asn Ile Leu Glu Lys Thr Ser Ala Ile Asp 1145 1150 1155
Leu Thr Asp Ile Asp Arg Ala Thr Glu Met Met Arg Lys Asn Ile 1160 1165 1170
Thr Leu Leu Ile Arg Ile Leu Pro Leu Asp Cys Asn Arg Asp Lys 1175 1180 1185
Arg Glu Ile Leu Ser Met Glu Asn Leu Ser Ile Thr Glu Leu Ser 1190 1195 1200
Lys Tyr Val Arg Glu Arg Ser Trp Ser Leu Ser Asn Ile Val Gly 1205 1210 1215
Val Thr Ser Pro Ser Ile Met Tyr Thr Met Asp Ile Lys Tyr Thr 1220 1225 1230
Thr Ser Thr Ile Ala Ser Gly Ile Ile Ile Glu Lys Tyr Asn Val 1235 1240 1245
Asn Ser Leu Thr Arg Gly Glu Arg Gly Pro Thr Lys Pro Trp Val 1250 1255 1260
Gly Ser Ser Thr Gln Glu Lys Lys Thr Met Pro Val Tyr Asn Arg 1265 1270 1275
Gln Val Leu Thr Lys Lys Gln Arg Asp Gln Ile Asp Leu Leu Ala 1280 1285 1290

ES 2 747 762 T3

Lys Leu	Asp Trp Val Tyr	Ala	Ser Ile Asp Asn Lys	Asp Glu Phe
1295		1300		1305
Met Glu	Glu Leu Ser Ile Gly	Thr Leu Gly Leu Thr	Tyr Glu Lys	
1310		1315		1320
Ala Lys	Lys Leu Phe Pro Gln	Tyr Leu Ser Val Asn	Tyr Leu His	
1325		1330		1335
Arg Leu	Thr Val Ser Ser Arg	Pro Cys Glu Phe Pro	Ala Ser Ile	
1340		1345		1350
Pro Ala	Tyr Arg Thr Thr Asn	Tyr His Phe Asp Thr	Ser Pro Ile	
1355		1360		1365
Asn Arg	Ile Leu Thr Glu Lys	Tyr Gly Asp Glu Asp	Ile Asp Ile	
1370		1375		1380
Val Phe	Gln Asn Cys Ile Ser	Phe Gly Leu Ser Leu	Met Ser Val	
1385		1390		1395
Val Glu	Gln Phe Thr Asn Val	Cys Pro Asn Arg Ile	Ile Leu Ile	
1400		1405		1410
Pro Lys	Leu Asn Glu Ile His	Leu Met Lys Pro Pro	Ile Phe Thr	
1415		1420		1425
Gly Asp	Val Asp Ile His Lys	Leu Lys Gln Val Ile	Gln Lys Gln	
1430		1435		1440
His Met	Phe Leu Pro Asp Lys	Ile Ser Leu Thr Gln	Tyr Val Glu	
1445		1450		1455
Leu Phe	Leu Ser Asn Lys Thr	Leu Lys Ser Gly Ser	His Val Asn	
1460		1465		1470
Ser Asn	Leu Ile Leu Ala His	Lys Ile Ser Asp Tyr	Phe His Asn	
1475		1480		1485

ES 2 747 762 T3

Thr Tyr Ile Leu Ser Thr Asn Leu Ala Gly His Trp Ile Leu Ile
1490 1495 1500

Ile Gln Leu Met Lys Asp Ser Lys Gly Ile Phe Glu Lys Asp Trp
1505 1510 1515

Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Asp His Met Phe Ile Asn Leu Lys Val
1520 1525 1530

Phe Phe Asn Ala Tyr Lys Thr Tyr Leu Leu Cys Phe His Lys Gly
1535 1540 1545

Tyr Gly Lys Ala Lys Leu Glu Cys Asp Met Asn Thr Ser Asp Leu
1550 1555 1560

Leu Cys Val Leu Glu Leu Ile Asp Ser Ser Tyr Trp Lys Ser Met
1565 1570 1575

Ser Lys Val Phe Leu Glu Gln Lys Val Ile Lys Tyr Ile Leu Ser
1580 1585 1590

Gln Asp Ala Ser Leu His Arg Val Lys Gly Cys His Ser Phe Lys
1595 1600 1605

Leu Trp Phe Leu Lys Arg Leu Asn Val Ala Glu Phe Thr Val Cys
1610 1615 1620

Pro Trp Val Val Asn Ile Asp Tyr His Pro Thr His Met Lys Ala
1625 1630 1635

Ile Leu Thr Tyr Ile Asp Leu Val Arg Met Gly Leu Ile Asn Ile
1640 1645 1650

Asp Arg Ile His Ile Lys Asn Lys His Lys Phe Asn Asp Glu Phe
1655 1660 1665

Tyr Thr Ser Asn Leu Phe Tyr Ile Asn Tyr Asn Phe Ser Asp Asn
1670 1675 1680

ES 2 747 762 T3

Thr His 1685	Leu Leu Thr Lys His 1690	Ile Arg Ile Ala Asn 1695	Ser Glu Leu
Glu Asn 1700	Asn Tyr Asn Lys Leu 1705	Tyr His Pro Thr Pro 1710	Glu Thr Leu
Glu Asn 1715	Ile Leu Ala Asn Pro 1720	Ile Lys Ser Asn Asp 1725	Lys Lys Thr
Leu Asn 1730	Asp Tyr Cys Ile Gly 1735	Lys Asn Val Asp Ser 1740	Ile Met Leu
Pro Leu 1745	Leu Ser Asn Lys Lys 1750	Leu Val Lys Ser Ser 1755	Ala Met Ile
Arg Thr 1760	Asn Tyr Ser Lys Gln 1765	Asp Leu Tyr Asn Leu 1770	Phe Pro Thr
Val Val 1775	Ile Asp Arg Ile Ile 1780	Asp His Ser Gly Asn 1785	Thr Ala Lys
Ser Asn 1790	Gln Leu Tyr Thr Thr 1795	Thr Ser His Gln Ile 1800	Ser Leu Val
His Asn 1805	Ser Thr Ser Leu Tyr 1810	Cys Met Leu Pro Trp 1815	His His Ile
Asn Arg 1820	Phe Asn Phe Val Phe 1825	Ser Ser Thr Gly Cys 1830	Lys Ile Ser
Ile Glu 1835	Tyr Ile Leu Lys Asp 1840	Leu Lys Ile Lys Asp 1845	Pro Asn Cys
Ile Ala 1850	Phe Ile Gly Glu Gly 1855	Ala Gly Asn Leu Leu 1860	Leu Arg Thr
Val Val 1865	Glu Leu His Pro Asp 1870	Ile Arg Tyr Ile Tyr 1875	Arg Ser Leu

ES 2 747 762 T3

Lys	Asp	Cys	Asn	Asp	His	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu	Phe	Leu	Arg	Leu
1880						1885					1890			
Tyr	Asn	Gly	His	Ile	Asn	Ile	Asp	Tyr	Gly	Glu	Asn	Leu	Thr	Ile
1895						1900					1905			
Pro	Ala	Thr	Asp	Ala	Thr	Asn	Asn	Ile	His	Trp	Ser	Tyr	Leu	His
1910						1915					1920			
Ile	Lys	Phe	Ala	Glu	Pro	Ile	Ser	Leu	Phe	Val	Cys	Asp	Ala	Glu
1925						1930					1935			
Leu	Pro	Val	Thr	Val	Asn	Trp	Ser	Lys	Ile	Ile	Ile	Glu	Trp	Ser
1940						1945					1950			
Lys	His	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Tyr	Cys	Ser	Ser	Val	Asn	Lys	Cys
1955						1960					1965			
Thr	Leu	Ile	Val	Lys	Tyr	His	Ala	Gln	Asp	Asp	Ile	Asp	Phe	Lys
1970						1975					1980			
Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Ile	Leu	Lys	Thr	Tyr	Val	Cys	Leu	Gly	Ser
1985						1990					1995			
Lys	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Val	Tyr	Leu	Val	Leu	Thr	Ile	Gly	Pro
2000						2005					2010			
Ala	Asn	Ile	Phe	Pro	Val	Phe	Asn	Val	Val	Gln	Asn	Ala	Lys	Leu
2015						2020					2025			
Ile	Leu	Ser	Arg	Thr	Lys	Asn	Phe	Ile	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Asp
2030						2035					2040			
Lys	Glu	Ser	Ile	Asp	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Leu	Ile	Pro	Phe	Leu
2045						2050					2055			
Cys	Tyr	Pro	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Leu	Ser	Lys
2060						2065					2070			

ES 2 747 762 T3

Leu Lys Ser Val Val Ser Gly Asp Ile Leu Ser Tyr Ser Ile Ala
2075 2080 2085

Gly Arg Asn Glu Val Phe Ser Asn Lys Leu Ile Asn His Lys His
2090 2095 2100

Met Asn Ile Leu Lys Trp Phe Asn His Val Leu Asn Phe Arg Ser
2105 2110 2115

Thr Glu Leu Asn Tyr Asn His Leu Tyr Met Val Glu Ser Thr Tyr
2120 2125 2130

Pro Tyr Leu Ser Glu Leu Leu Asn Ser Leu Thr Thr Asn Glu Leu
2135 2140 2145

Lys Lys Leu Ile Lys Ile Thr Gly Ser Leu Leu Tyr Asn Phe His
2150 2155 2160

Asn Glu
2165

<210> 7

<211> 194

<212> PRT

5 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 7

Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu
1 5 10 15

Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro
20 25 30

His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys
35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala
50 55 60

ES 2 747 762 T3

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu
65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys
85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys
100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr
115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln
130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro
165 170 175

Lys Glu Leu Thr Val Ser Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp
180 185 190

Thr Thr

<210> 8

<211> 90

5 <212> PRT

<213> virus respiratorio sincitial

<400> 8

Met Thr Met Pro Lys Ile Met Ile Leu Pro Asp Lys Tyr Pro Cys Ser
1 5 10 15

Ile Thr Ser Ile Leu Ile Thr Ser Arg Cys Arg Val Thr Met Tyr Asn
20 25 30

Arg Lys Asn Thr Leu Tyr Phe Asn Gln Asn Asn Pro Asn Asn His Met
35 40 45

Tyr Ser Pro Asn Gln Thr Phe Asn Glu Ile His Trp Thr Ser Gln Asp
50 55 60

Leu Ile Asp Thr Ile Gln Asn Phe Leu Gln His Leu Gly Val Ile Glu
65 70 75 80

Asp Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Leu Val Ser
85 90

10 <210> 9

ES 2 747 762 T3

<211> 241
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 9

```

Met Glu Lys Phe Ala Pro Glu Phe His Gly Glu Asp Ala Asn Asn Arg
1           5           10           15

Ala Thr Lys Phe Leu Glu Ser Ile Lys Gly Lys Phe Thr Ser Pro Lys
          20           25           30

Asp Pro Lys Lys Lys Asp Ser Ile Ile Ser Val Asn Ser Ile Asp Ile
          35           40           45

Glu Val Thr Lys Glu Ser Pro Ile Thr Ser Asn Ser Thr Ile Ile Asn
          50           55           60

Pro Thr Asn Glu Thr Asp Asp Asn Ala Gly Asn Lys Pro Asn Tyr Gln
65           70           75           80

Arg Lys Pro Leu Val Ser Phe Lys Glu Asp Pro Ile Pro Ser Asp Asn
          85           90           95

Pro Phe Ser Lys Leu Tyr Lys Glu Thr Ile Glu Thr Phe Asp Asn Asn
          100          105          110

5  Glu Glu Glu Ser Ser Tyr Ser Tyr Glu Glu Ile Asn Asp Gln Thr Asn
          115           120           125

```

ES 2 747 762 T3

Asp Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asp Arg Ile Asp Glu Lys Leu Ser Glu
130 135 140

Ile Leu Gly Met Leu His Thr Leu Val Val Ala Ser Ala Gly Pro Thr
145 150 155 160

Ser Ala Arg Asp Gly Ile Arg Asp Ala Met Val Gly Leu Arg Glu Glu
165 170 175

Met Ile Glu Lys Ile Arg Thr Glu Ala Leu Met Thr Asn Asp Arg Leu
180 185 190

Glu Ala Met Ala Arg Leu Arg Asn Glu Glu Ser Glu Lys Met Ala Lys
195 200 205

Asp Thr Ser Asp Glu Val Ser Leu Asn Pro Thr Ser Glu Lys Leu Asn
210 215 220

Asn Leu Leu Glu Gly Asn Asp Ser Asp Asn Asp Leu Ser Leu Glu Asp
225 230 235 240

Phe

- 5 <210> 10
<211> 139
<212> PRT
<213> virus respiratorio sincitial

<400> 10

Met Gly Ser Asn Ser Leu Ser Met Ile Lys Val Arg Leu Gln Asn Leu
1 5 10 15

Phe Asp Asn Asp Glu Val Ala Leu Leu Lys Ile Thr Cys Tyr Thr Asp
20 25 30

Lys Leu Ile His Leu Thr Asn Ala Leu Ala Lys Ala Val Ile His Thr
35 40 45

ES 2 747 762 T3

Ile Lys Leu Asn Gly Ile Val Phe Val His Val Ile Thr Ser Ser Asp
50 55 60

Ile Cys Pro Asn Asn Asn Ile Val Val Lys Ser Asn Phe Thr Thr Met
65 70 75 80

Pro Val Leu Gln Asn Gly Gly Tyr Ile Trp Glu Met Met Glu Leu Thr
85 90 95

His Cys Ser Gln Pro Asn Gly Leu Ile Asp Asp Asn Cys Glu Ile Lys
100 105 110

Phe Ser Lys Lys Leu Ser Asp Ser Thr Met Thr Asn Tyr Met Asn Gln
115 120 125

Leu Ser Glu Leu Leu Gly Phe Asp Leu Asn Pro
130 135

<210> 11

<211> 124

5 <212> PRT

<213> virus respiratorio sincitial

<400> 11

Met Asp Thr Thr His Asn Asp Thr Thr Pro Gln Arg Leu Met Ile Thr
1 5 10 15

Asp Met Arg Pro Leu Ser Leu Glu Thr Thr Ile Thr Ser Leu Thr Arg
20 25 30

Asp Ile Ile Thr His Arg Phe Ile Tyr Leu Ile Asn His Glu Cys Ile
35 40 45

Val Arg Lys Leu Asp Glu Arg Gln Ala Thr Phe Thr Phe Leu Val Asn
50 55 60

Tyr Glu Met Lys Leu Leu His Lys Val Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Lys
65 70 75 80

Tyr Thr Glu Tyr Asn Thr Lys Tyr Gly Thr Phe Pro Met Pro Ile Phe
85 90 95

Ile Asn His Asp Gly Phe Leu Glu Cys Ile Gly Ile Lys Pro Thr Lys
100 105 110

His Thr Pro Ile Ile Tyr Lys Tyr Asp Leu Asn Pro
115 120

<210> 12
 <211> 1725
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial

5 <400> 12

auggaguugc caauccucaa agcaaaugca auuaccacaa uccucgcugc agucacauuu	60
ugcuuugcuu cuagucaaaa caucacugaa gaauuuuauuc aaucaacaug cagugcaguu	120
agcaaaggcu aucuuagugc ucuaagaacu gguugguaua cuaguguuau aacuaauagaa	180
uuaguaaaua ucaaggaaaa uaaguguaau ggaacagaug cuaagguaaa auugauaaac	240
caagaauuag auaaaauaaa aaauugcugua acagaauugc aguugcucau gcaaagcaca	300
acagcagcaa acaaucgagc cagaagagaa cuaccaaggu uuaugaauua uacacucaac	360
aaauacaaaa aaaccaaugu aacauuaagc aagaaaagga aaagaagauu ucuugguuuu	420
uuguuaggug uuggaucugc aaucgccagu ggcauugcug uaucuaaggu ccugcacuaa	480
gaaggagaag ugaacaagau caaaagugcu cuacuaacca caaacaaggc cguagucagc	540
uuaucaaaug gaguuagugu cuuaaccagc aaaguguuag accucaaaaa cuauauagau	600
aaacaauugu uaccuauugu gaauaagcaa agcugcagaa uaucaaaauu agaaacugug	660
auagaguucc aacaaaagaa caacagacua cuagagauua ccagggaauu uaguguuaau	720
gcagguguaa cuacaccugu aagcacuuac auguuacua auagugaauu auugucauaa	780
aucaaugaua ugccuauaac aaaugaucag aaaaaguuaa uguccaacaa uguucaaua	840
guuagacagc aaaguuacuc uaucaugucc auaaauaaag aggaagucuu agcauaugua	900
guacaauuac cacuaauagg ugugauagau acaccuuguu ggaaauuaca cacaucccu	960
cuauguacaa ccaacacaaa agaaggguca acaucuguu uaacaagaac ugacagagga	1020

ugguacugug acaaugcagg aucaguaucu uucuucccac aagcugaaac auguaaaguu 1080
 caaucgaauC gaguaauuuug ugacacaaug aacaguuuuaa cauuaccaag ugaaguaaaU 1140
 cucugcaaug uugacauauu caaucccaaa uaugauugua aaauuugac uucaaaaaca 1200
 gauguaagca gcuccguuau cacaucucua ggagccauug ugucaugcua uggcaaaacu 1260
 aaauguacag cauccaauaa aaaucgugga aucauaaaga cauuuucuaa cgggugugau 1320
 uauguaucaa auaaaggguu ggacacugug ucuguaggua acacauuaua uuauguaaaU 1380
 aagcaagaag gcaaaagucu cuauguaaaa ggugaaccaa uaauaaaauu cuaugacca 1440
 uuaguauucc ccucugauga auuugaugca ucaauaucuc aagucaauga gaagauaac 1500
 cagaguuuag cauuuauucg uaaauccgau gaauuauuac aucauguaaa ugcugguaaa 1560
 ucaaccacaa auaucaugau aacuacuaua auuauaguga uuauaguaau auuguuauca 1620
 uuaauugcug uuggacugcu ccuauacugu aaggccagaa gcacaccagu cacacuaagc 1680
 aaggaucaac ugagugguau aaauaaauu gcauuuagua acuga 1725

<210> 13
 <211> 897
 5 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial
 <400> 13

auguccaaaa acaaggacca acgcaccgcu aagacacuag aaaagaccug ggacacucuc 60
 aaucuuuuau uauucauauc aucgggcuua uuaaguuaa aucuuaaauc uauagcacia 120
 aucacuuau ccauucuggc aaugauaauc ucaacuucac uuauaaauac agccaucua 180
 uucauagccu cggcaaacca caaagucaca cuaacaacug caaucauaca agaugcaaca 240
 agccagauca agaacacaac cccaacauac cucacucagg auccucagcu uggaaucagc 300
 uucuccaauc ugucugaaaU uacauacaa accaccacca uacuagcuuc aacaacacca 360
 ggagucaagu caaaccugca acccacaaca gucaagacua aaaacacaac aacaacccaa 420
 acacaaccca gcaagcccac uacaaaaaa cgccaaaaca aaccaccaa caaacccaaU 480
 aaugauuuuc acuucgaagu guuuuacuuu guaccugca gcauauagcag caacaaucca 540
 accugcuggg cuaucugcaa aagaauacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc 600
 aagccuacaa aaaaaccaac cuucaagaca accaaaaag aucucaaacc ucaaacacu 660
 aaaccaaagg aaguaccac caccaagccc acagaagagc caaccaucaa caccacaaa 720
 acaaacauca caacuacacu gcucaccaac aacaccacag gaaauccaaa acucacaagu 780
 caaugggaaa ccuuccacuc aaccuccucc gaaggcauuc uaagcccuuc ucaagucucc 840
 10 acaacaucg agcacccauc acaaccuca uuccaccca acacaacacg ccaguag 897

<210> 14
 <211> 195
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial

5 <400> 14

auggaaaaua cauccauaac aaugaauuc ucaagcaau ucuggccuua cuuuacacua	60
auacacauga ucacaacaau aaucucuug cuaaucaua ucuccaucau gacugcaua	120
cuaaacaac uuugugaaua uacguauuc cauaacaaa ccuuugagu accaagagcu	180
cgagucaaca cauag	195

<210> 15
 <211> 771
 <212> ARN

10 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 15

auggaaacau acgugaacaa gcuucacgaa ggcuccacau acacagcugc uguucaauac	60
aauguccuag aaaaagacga ugaccugca ucacuuacaa uaugggugcc cauguuccaa	120
ucaucuagc cagcagauuu acuuauaaaa gaacuagcua augucaacau acuagugaaa	180
caauaucca caccagagg accuucacua agagucauga uaaacucaag aagugcauug	240
cuagcacaaa ugcccagcaa auuuaccua ugugcuauug uguccuugga ugaaagaagc	300
aaacuggcau augauguaac cacaccugu gaaaucaagg cauguagucu aacaugccua	360
aaaucaaaaa auauuuuac uacaguuaa gaucucacua ugaagacacu caacccaca	420
caugauuuu uugcuuuug ugaauuugaa aacauagua caucaaaaa agucauaaua	480
ccaacauacc uaagaucac cagugucaga aauaaagauc ugaacacacu ugaaaauua	540
acaaccacug aaaucaaaaa ugccaucaca aaugcaaaaa ucaucccuua cucaggauua	600
cuauuaguc ucacagugac ugacaacaaa ggagcauua aaucacuaaa gccgcaaagu	660
caauucauag uagaucuugg agcuuaccua gaaaaagaa guauauuuu uguuaccaca	720
aaugggaagc acacagcuac acgauuugca aucaaaccac uggaagauua a	771

<210> 16
 <211> 1176
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial

15

<400> 16

ES 2 747 762 T3

```

auggcucuua gcaaagucaa guugaaugau acacucaaca aagaucaacu ucugucaucu      60
agcaauuaca ccauccaacg gagcacagga gauaguauug auacuccuaa uuauaugug      120
cagaaacaca ucaauaaguu auguggcaug uuauuaauca cagaagaugc uaaucuaaaa      180
uucacugggu uauuagguau guuauaugcu augucuaggu uaggaagaga agacaccaua      240
aaaauacuca gagaugcggg auaucaugua aaagcaaaug gaguagaugu aacaacacau      300
cguaagaca ucaaugggaa agaaaugaaa uuugaagugu uaacauuggc aagcuuaaca      360
acugaaauuc aaaucaacau ugagauagaa ucuagaaaau ccuacaaaaa aaugcuaaaa      420
gaaaugggag agguagcucc agaauacagg cauguuucuc cuguuugugg gaugauaaua      480
uuauguauag cagcauuagu aaauaccaa uuggcagcag gggauagauc uggucuuaa      540
gccgugauua ggagagcuua uauuguccua aaaaugaaa ugaaacguua caaaggcuua      600
cuaccaagg auauagcaa cagcuucuau gaaguguuug aaaaacaucc ccacuuuaua      660
gauguuuuug uucauuuugg uauagcacia ucuuccacca gagguaggcag uagaguugaa      720
gggauuuuug caggauuguu uaugaugcc uauugugcag ggcaaguaau gcuacggugg      780
ggagucuua gcaaaucagu uaaaaauuu auguuaggac augcuagugu gcaagcagaa      840
auggaacaag uuguugaggu uuaugaauu gcccataauu uggguaggaga agcaggauuc      900
uaccuauau ugaacaacc aaaagcauca uuauuauuu ugacucauu uccucacuuu      960
uccaguguag uauuaggcaa ugcugcuggc cuaggcauaa ugggagagua cagagguaca      1020
ccgaggaauc aagaucaua ugaugcagca aaggcauug cugaacaacu caaagaaaau      1080
ggugugauua acuacagugu auuagacuug acagcagaag aacuagaggc uaucaaacau      1140
cagcuuaa caaaagauaa ugauguagag cuuuga      1176

```

<210> 17

<211> 6498

<212> ARN

5 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 17

ES 2 747 762 T3

auggauccca	uuauuaaugg	aaauucugcu	aauguuuauuc	uaaccgauag	uuauuuaaaa	60
gguguuaucu	cuuucucaga	guguaaugcu	uuaggaaguu	acauauuca	ugguccuuau	120
cuaaaaaaug	auuauacca	cuuaauuagu	agacaaaauc	cauuauuaga	acacaugaa	180
cuaaagaaac	uaaaauuaac	acaguccua	auaucuaagu	aucauaaagg	ugaaauaaaa	240
uuagaagagc	cuacuuuuu	ucagucuuu	cuuaugacau	acaagaguau	gaccucguug	300
gaacagauug	cuaccacua	uuuacuuuu	aagauauua	gaagagcuau	agaaauaagu	360
gaugucaaag	ucuaugcuau	auugaauaaa	cuagggcua	aagaaaagga	caagauuuu	420
uccaacaau	gacaggauga	agacaacuc	guuuuuacg	ccauaauc	agaugauua	480
cuuucagcug	uuagggaau	ucaaucuca	cuuaagcag	acaaaauca	cucuaaaaa	540
caaaaagaca	caaucaaac	aacacucug	aagaaauua	uguguucau	gcagcauccu	600
ccaucauggu	uaauacauug	guuuauuuu	uacacaaa	uaaacaacu	auaacacag	660
uaucgauca	augagguua	aaaccaugg	uuuauuuu	uagauauca	aacucuuag	720
ggauuucau	uuauuuuga	ucaauauggu	uguauaguu	aucuaagga	acuaaaaag	780
auuacuguga	caaccuaua	ucaauucug	acauggaag	auuuuagcc	uaguagauu	840
aauguuugu	uaauuacug	gauuagua	ugcuugaac	cauuuuuu	aagcuuagg	900
uuagaugcg	gauucaaua	uguuaucu	acacaacu	uccuuuagg	ugauuguua	960
cuaaagcuu	uucacauga	ggguucuc	auuuuuuag	agguagagg	uuuuuuuag	1020
ucucuaauu	uaauuuuac	agaagaagu	caauucaga	aacgauuuu	uaauagua	1080
cuaaaca	ucacagauc	ugcuauuu	gcucagaaa	aucugcuac	aagaguau	1140
cauacauu	uagauagac	aguauccga	auuuuuuu	auggcaga	gauuuuuc	1200
uuaguaagu	uccuuuuuu	auuuuagcu	gcaggugac	auaacuuu	caaucugag	1260
gaacuaauu	uuuuguuc	auuuuugga	caccaaugg	uagaugaa	acaagccau	1320

gaugcuguua aaguuaauug caaugagacc aaauuuuacu uguuaagcag uuugaguauug	1380
uuagaggug cccuuauua uagaauuaa aaaggguuug uaaaauuaa caacagaug	1440
ccuacuuuaa gaaaugcuau uguuuuaccc uuaagauggu uaacuuacua uaaacuaaac	1500
acuuauccuu cuuuguugga acuuacagaa agagauuuga uuuguuuauc aggacuacgu	1560
uucuaucgug aguuuuuggu gccuaaaaaa guggaucuug aaauugauau aaaugauaaa	1620
gcuauaucac cccuaaaaaa uuugauaugg acuaguuucc cuagaaauua uauccguca	1680
cacauacaaa acuaauuaga acaugaaaaa uuaaaauuuu ccgagaguga uaaaaucaaga	1740
agaguauuag aguauuuuuu aagagauaac aaauucaaug aaugugauuu auacaacugu	1800
guaguuauc aaaguuauc caacaacccu aaucaugugg uaucauugac aggcaaagaa	1860
agagaacuca guuguuggu aauguuugca augcaaccgg gaauuucag acagguucaa	1920
auauuggcag agaaaugau agcuagaaac auuuuacaa ucuuuccuga aagucuuaa	1980
agauauggug aucuagaacu acaaaaaa uuagaauuga aagcaggaau aaguaacaaa	2040
ucaaucgcu acaaugauaa uuacaacaa uacauuagua agugcucuau caucacagau	2100
cucagcaaa ucaaucaagc auuucgauau gaaacgucau guauuuguag ugaugugcug	2160
gaugaacugc augguuguaca aucucuauuu uccugguuac auuuuacuau uccucauguc	2220
acaauauau gcacauuag gcaugcacc cccuauuaa gagaucauau uguagaucuu	2280
aaauauguag augaacaag uggauuuau agauaucaca uggguuguau ugaaggguug	2340
uguaaaaaac uauggaccu agaagcuua ucacuauugg aucuaauauc ucucaaagg	2400
aaauucuaa uuacugcuuu aaauaauggu gacaaucau caauagauau aagcaaacca	2460
gucagacuca uggaagguca aacucaugcu caagcagauu auuugcuagc auuaauagc	2520
cuuaauuac uguauaaaga guaugcaggc auaggucaca aaauaaaagg aacugagacu	2580
uauauaucac gagauaugca auuuuagagu aaacaaauuc aacauaacgg uguauuuuac	2640
ccugcuagua uaaagaaagu ccuaagagug ggaccgugga uaaacacuau acuugaugau	2700
uucaaaguga gucuagaauc uauagguagu uugacacaag aaauagaaua uagaggugaa	2760
agucuauuau gcaguuaau auuuagaaau guaugguuau auaucaaa ugcucuacaa	2820
uuaaaaaauc augcguuug uaaacauaaa uuauuuuugg acauuuuaa gguucugaaa	2880

cacuuaaaaa ccuuuuuuuaa ucuugauaa uugauacag cauuaacauu guauaugaau	2940
uuacccaugu uauuuggugg uggugauccc aacuuguuau aucgaaguuu cuauagaaga	3000
acuccugauu uccucacaga ggcuauaguu cacucugugu ucauacuag uuauuuaca	3060
aaccaugacu uaaaagauaa acuucaagau uugucagaug auagauugaa uaaguucua	3120
acaugcauaa ucacguuuga caaaaacccu aaugcugaau ucguaacauu gaugagagau	3180
ccuacagcuu uagggucuga gagacaagcu aaaaauuacua gugaaaucaa uagacuggca	3240
guuacagagg uuugaguac agcuccaaac aaaauuuu uccaaaagugc acaacauuau	3300
accacuacag agauagauu aaugauuuu augcaaaaua uagaaccuac auauccucac	3360
gggcuaagag uuguuuuuga aaguuuaccc uuuuauaaag cagagaaaau aguaaaucuu	3420
auaucaggua caaaaucuaa aacuaacuaa cuggaaaaga cuucugccau agacuuaca	3480
gauauugua gagccacuga gaugaugagg aaaaacauaa cuuugcuuau aaggauacu	3540
ccauuggauu guaacagaga uaaaagagaa auauugagua uggaaaaccu aaguauacu	3600
gaauuaagca aaauuguuag ggaaagauu uggucuuuuu ccaauuagu ugguguuaca	3660
ucaccagua ucauguauac aauggacauc aaauuacaa caagcacuau agcuaguggc	3720
auaaauuag agaaaauaa uguuaacagu uuaacacgug gugagagagg accaacuaaa	3780
ccauggguug guucaucuac acaagagaaa aaaacaauugc caguuuuuaa uagacaagu	3840
uuacccaaaa acaaaagaga ucaauuagau cuauuagcaa aauggauug gguguaugca	3900
ucuauagaua acaaggaua auucauggaa gaacucagca uaggaacccu uggguuaaca	3960
uagaaaagg ccaaaaaau auuuccacaa uauuuuagug ucaacuauuu gcaucgccu	4020
acagucagua guagaccaug ugaauuccu gcaucaauac cagcuuauag aacaacaa	4080
uauacuuug acacuagccc uauuaaucgc auauuacag aaaaguugg ugaugaagau	4140
auugacauag uauuccaaaa cuguauaagc uuuggccuua gcuaaauugc aguaguaga	4200
cauuuacua auguauugc uacagaauu auucucauac cuaagcuua ugagauacu	4260
uugaugaaac cuccauuuu cacaggugau guugauuuc acaaguuaa acaugaua	4320
caaaaacagc auauuuuuu accagacaaa auuaguuuga cucaauaugu ggaauuuuc	4380
uuaguaaca aaacacuaa aucuggauu cauguuauu cuauuuuuu auuggcacau	4440

aaaauaucug	acuauuuuca	uaauacuuac	auuuuaagua	cuaauuuagc	uggacauugg	4500
auucuaauua	uacaacuuau	gaaagauucu	aaagguauuu	uugaaaaaga	uuggggagag	4560
ggauauauaa	cugaucuau	guuuauuuau	uugaaaguuu	ucuucaaugc	uuauaagacc	4620
uauucucuugu	guuuucauaa	agguuauggc	aaagcaaaac	uggaguguga	uaugaacacu	4680
ucagaucuu	uauuguuuu	ggaauuaaua	gacaguaguu	auuggaaguc	uauucuaag	4740
guauuuuuag	aacaaaaagu	uaucaauuac	auucuuagcc	aagaugcaag	uuuacauaga	4800
guaaaaggau	gucauagcuu	caauuuuagg	uuucuuuaac	gucuuuaugu	agcagauuuu	4860
acaguuugcc	cuuggguugu	uaacauagau	uaucauccaa	cacauaugaa	agcaauuuu	4920
acuuauauag	auucuuuuag	aauggguuug	auaaaauauag	auagaauaca	cauuaaaaau	4980
aaacacaaa	ucaaugauga	auuuuuuacu	ucuaaucucu	uuuacauuaa	uuauaacuuc	5040
ucagauaaua	cucaucuuuu	aacuaaacau	auaaggauug	cuaauucaga	auuagaaaau	5100
aaauacaaca	aaauuuuauca	uccuacacca	gaaacccuag	agaauuuacu	agccaauccg	5160
auuuuuuagua	augacaaaaa	gacacugaac	gacuuuuuua	uagguaaaaa	uguugacuca	5220
auaauuuuac	cauuguuuac	uaauaagaag	cuuguuuuuu	cgucugcaau	gauuagaacc	5280
aaauacagca	aacaagaccu	guacaauua	uucccuacgg	uugugaucga	uagaauuuu	5340
gaucauucag	guauuacagc	caauuccaac	caacuuuaca	cuacuacuuc	ccaucaaua	5400
ucuuuagugc	acaauagcac	aucacuuuu	ugcaugcuuc	cuuggcauca	uauuuuaga	5460
uucauuuuug	uauuuuaguuc	uacagguugu	aaaauuuagua	uagaguauau	uuuuuuagac	5520
cuuuuuuuu	aagauccuaa	uuguauagca	uucauaggug	aaggagcagg	gaauuuuuu	5580
uugcgucag	ugguggaacu	ucauccugac	auaagauua	uuuacagaag	ucugaaagau	5640
ugcaaugauc	auaguuuacc	uauugaguuu	uuuaggcuau	acaauaggaca	uaucaacauu	5700
gauuuaggug	aaaauuugac	cauuccugcu	acagaugcaa	ccaacaacau	ucauuggucu	5760
uauuuacaua	uaaaguuugc	ugaaccuau	agucuuuuug	uauugaugc	cgaauugccu	5820
guuacaguca	acuggaguua	aaauuuuuu	gaauaggagca	agcauguaag	aaaauugcaag	5880
uacuguuccu	caguuaauaa	auguacguua	auaguuuuu	aucaugcuca	agaugauuu	5940
gauuucaauu	uagacaauau	aacuuuuuu	aaaacuuuag	uauugcuagg	caguauuuu	6000

ES 2 747 762 T3

aagggauagg agguuuuacu aguccuuaca auagguccug caaaauauuu uccaguauuu	6060
aauguaguac aaaaugcuua auugauacua ucaagaacca aaaaauuucu augccuaag	6120
aaagcugaua aagagucua ugaugcaaa auuuuuuuuu ugauacccuu uuuuuuuuac	6180
ccuauaaca aaaaaggaa uauuacugca uugucaaaac uaaagagugu uguuagugga	6240
gauauacuau cauauucuau agcuggacgg aaugaaguuu ucagcaaua acuuauaaa	6300
cauaagcaua ugaacauuu aaagugguuc aaugaaguuu uaaaauucag aucaacagaa	6360
cuaaacuaa accauuuua uauugguaga ucuacauuc cuuaccuaag ugaauuguua	6420
aacagcuuga caacuaaga acuuuuuuuu cugauuuuuu ucacagguag ucuguuuuac	6480
aacuuuaua augaauaa	6498

5 <210> 18
 <211> 585
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 18

augucacgaa ggaauccuug caaaauugaa auucgagguc auugcuugaa ugguaagaga	60
ugucauuuuu gucauaauua uuuugaauug ccaccccaug cacugcucgu aagacaaaac	120
uuuauuguua acagaauacu uaagucuaug gaaaaagua uagauaccuu aucagaaaua	180
aguggagcug cagaguugga cagaacagaa gaguaugcuc uugguguagu uggagugcua	240
gagaguuaa uaggaucau aaauauua acuaaaacu cagcaugugu ugccaugagc	300
aaacuccuca cugaacuaa uagugaugau aucaaaaaac ugagagacaa ugaagagcua	360
aaucaccca agauaagagu guacaauacu gucauauca auauugaaag caacaggaaa	420
aaauuuuac aaacuauca ucuguuuuuu agauugccag cagacguuu gaagaaaacc	480
aucaaaaaca cauuggauu ccacaagagc auaaccauca acaacccaaa agaauuacu	540
guuagugaua caaauagca ugccaaaaau auugauacua ccuga	585

10 <210> 19
 <211> 273
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial

<400> 19

ES 2 747 762 T3

augaccaugc caaaaauauu gauacuaccu gacaaaauuc cuuguaguau aacuuccaua 60
 cuaauaaca guagauguag agucacuaug uauaaucgaa agaacacacu auauuucaau 120
 caaaacaacc caaauaacca uauguacuca ccgaaucaaa cauucaauga aauccauugg 180
 accucacaag acuugauuga cacaauuca aauuuucua agcaucuagg uguuuuugag 240
 gauauauaua caauauauau auuaguguca uaa 273

5 <210> 20
 <211> 726
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial
 <400> 20

auggaaaagu uugcuccuga auuccaugga gaagaugcaa acaacagggc uacuaaaauuc 60
 cuagaaucaa uaaaggggcaa auucacauca ccuaaagauc ccaagaaaa agauaguauuc 120
 auaucuguca acucaauaga uauagaagua accaaagaaa gcccuauaac aucaaaauca 180
 accauuuaua acccaacaaa ugagacagau gauaaugcag ggaacaagcc caauuaucaa 240
 agaaaaccuc uaguaaguuu caaagaagac ccuaauacaa gugauaaucc cuuuucaaaa 300
 cuauacaaag aaaccuauaga gacauuugau aacaauagaag aagaaucuag cuauucauau 360
 gaagaaauaa augaucagac gaacgauaua auaacugcaa gauuagauag gauugaugaa 420
 aaauuaagug aaauacuagg aaugcuucac acauuaguag uagcaagugc aggaccuaca 480
 ucugcuaggg augguauaag agaugccaug guugguuuua gagaagaaau gauagaaaaa 540
 aucagaacug aagcauuaua gaccaaugac agauuagaag cuauggcaag acucaggaau 600
 gaggaagug aaaagauaggc aaaagacaca ucagaugaag ugucucucua uccaacauca 660
 gagaaauuga acaaccuguu ggaagggaau gauagugaca augaucuauc acuugaagau 720
 uucuga 726

10 <210> 21
 <211> 420
 <212> ARN
 <213> virus respiratorio sincitial
 <400> 21

15 augggcagca auucguugag uaugauaaaa guuagauuac aaaaauuuguu ugacaugau 60

ES 2 747 762 T3

	gaaguagcau uguuaaaaau aacaugcuau acugacaaau uaauacauuu aacuaaugcu	120
	uuggcuaagg cagugauaca uacaaucaaa uugaauggca uuguguuugu gcauguuauu	180
	acaaguagug auuuuugccc uaauaauaau auuguaguua aauccaauuu cacaacaug	240
	ccagugcuac aaaauggagg uuauauaugg gaaaugaugg aaauaacaca uugcucucaa	300
	ccuaaugguc uaauagauga caauugugaa auuauuuucu ccaaaaaacu aagugauuca	360
	acaaugacca auuauaugaa ucaauuauuc gaauuacuug gauuugaucu uaauccauaa	420
	<210> 22	
	<211> 375	
	<212> ARN	
5	<213> virus respiratorio sincitial	
	<400> 22	
	auggacacaa cccacaauga uaccacacca caaagacuga ugaucacaga caugagaccg	60
	uugucacuug agacuacaau aacaucacua accagagaca ucauaacaca cagauuuaua	120
	uacuuauaau aucaugaau cauagugaga aaacuugaug aaagacaggc cacauuuaca	180
	uuccugguca acuaugaaau gaaacuauug cacaaguag gaagcacuaa auauaaaaaa	240
	uauacugaau acaacacaaa auauaggcacu uucccuauug cgauuuuau caaucaugau	300
	ggguucuuag aaugcauugg cauuagccu acaaagcaua cucccauau auacaaguau	360
	gaucucaauc cauag	375
	<210> 23	
	<211> 42	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 23	
	ggcgctgcct acggaggtgg cagccatctc cttctoggca tc	42
	<210> 24	
15	<211> 186	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 24	
	catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa	60
	aagcttattc atctgttttt ctttttcgtt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac	120
	ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa	180
20	gaatct	186
	<210> 25	
	<211> 186	
	<212> ADN	

	<213> Homo sapiens	
	<400> 25	
	catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa	60
	tagcttattc atctcttttt ctttttcggt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac	120
	ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa	180
	gaacct	186
5	<210> 26 <211> 110 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 26	
	gctggagcct cggtagccat gcttcttgcc ccttgggcct cccccagcc cctcctcccc	60
	ttcctgcacc cgtacccccg tggcttttga ataaagtctg agtgggcggc	110
10	<210> 27 <211> 108 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 27	
	gctggagcct cggtagccgt tcctcctgcc cgctgggcct cccaacgggc cctcctcccc	60
15	tccttgcacc ggcccttcct ggtctttgaa taaagtctga gtgggcag	108
	<210> 28 <211> 132 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 28	
	gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccttaa gtccaactac	60
	taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaata aaaaaacatt	120
	tattttcatt gc	132
25	<210> 29 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Centro, parte unión a alfa-complejo de la 3'UTR de un gen de alfa-globina (muag)	
	<400> 29	
30	gcccgatggg cctcccaacg ggccctcctc cctccttgc accg	44

- <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> secuencia tallo-*bucle de histona particularmente preferente
- <400> 30
- caaaggctct tttcagagcc acca 24
- 10 <210> 31
 <211> 1942
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> RSV-F long (GC) R1691
- 15 <400> 31
- | | |
|--|-----|
| gggagaaaagc uuaccaugga gcugcccauc cucaaggcca acgccaucac caccauccug | 60 |
| gcggccguga cguucugcuu cgccagcucc cagaacauca ccgaggaguu cuaccagagc | 120 |
| accugcuccg ccgucagcaa gggcuaccug uccgcccucc ggaccgggug guacacgagc | 180 |
| gugaucacca ucgagcuguc caacaucaag gagaacaagu gcaacggcac cgacgcgaag | 240 |
| gugaagcuga ucaaccagga gcucgacaag uacaagaacg ccgucaccga gcugcagcug | 300 |
| cucaugcaga gcacgaccgc cgccaacaac cgcgcgcggc gcgagcugcc gcgguucaug | 360 |
| aacuacaccc ugaacaacac caagaagacg aacgugaccc ucuccaagaa gcgcaagcgg | 420 |

ES 2 747 762 T3

cgcuuccugg gguuccugcu cggcgugggg agcgccaucg ccuccggcau cgccgucagc 480
 aaggugcugc accuggaggg cgaggugaac aagaucagu ccgcccuccu gaggaccaac 540
 aaggcggucg uguccugag caacggggug uccguccuca ccagcaaggu gcuggaccug 600
 aagaacuaca ucgacaagca gcuccugccc aucgugaaca agcaguccug ccggaucagc 660
 acaucgaga cggucaucga guuccagcag aagaacaacc gccugcucga gaucacccgg 720
 gaguucagcg ugaacgccgg cgugaccacc cccgucucca cguacaugcu gaccaacagc 780
 gagcugcucu cccugaucaa cgacaugccc aucaccaacg accagaagaa gcugaugagc 840
 aacaacgugc agaucgugcg ccagcagucc uacagcauca uguccaucan caaggaggag 900
 guccucgccu acguggugca gcugccgcug uacgggguca ucgacacccc cugcuggaag 960
 cuccacacga gccccugug caccaccaac accaaggagg gcuccaaucau cugccugacg 1020
 cggaccgacc gcggguggua cugcgacaac gccggcagcg uguccuucuu ccccaggcc 1080
 gagaccugca agguccagag caaccgggug uucugcgaca ccaugaacuc ccucacgcug 1140
 ccgagcgagg ugaaccugug caacgucgac aucuuaacc ccaaguacga cugcaagau 1200
 augaccucca agaccgacgu gagguccagc gugauaccu cccucggcgc gaucgucagc 1260
 ugcuaaggga agacgaagug caccgccagc aacaagaacc gcggcaucau caagaccuuc 1320
 uccaacgggu gcgacuacgu gagcaacaag ggcguggaca ccgucuccgu gggcaacacc 1380
 cuguacuacg ugaacaagca ggagggggaag agccuguacg ucaaggcgga gcccauau 1440
 aacuucuaag acccccucgu guucccgucc gacgaguucg acgccagcau cuccaggug 1500
 aacgagaaga ucaaccagag ccuggccuuc auccggaagu ccgacgagcu gcugcaccac 1560
 gucaacgccg ggaagagcac gaccaacauc augaucacca ccaucaucau cgugaucau 1620
 gugauccucc uguccugau cgcgguccgc cuccugcugu acugcaaggc ccgcagcacg 1680
 cccgugaccc ucuccaagga ccagcugagc gggaucaaca acaucgccuu cuccaacuga 1740
 ggacuaguuu uaagacugac uagcccgaug ggccuccaa cgggcccucc ucccuccuu 1800
 gcaccgagau uaauaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860
 aaaaaaaaaa aaaaaaaug caucaccccc ccccccccc ccccccccc ccccaaggc 1920
 uuuuuucaga gccaccagaa uu 1942

<210> 32

<211> 2107

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSV-F long (GC) R2510

<400> 32

ggggcgugc cuacggaggu ggagccauc uccuucucgg caucaagcuu accauggagc 60
 ugcccauccu caaggccaac gccaucacca ccauccuggc ggccgugacg uucugcuucg 120
 ccagcuccca gaacaucacc gaggaguucu accagagcac cugcuccgcc gucagcaagg 180
 gcuaccuguc cgccuccgg accggguggu acacgagcgu gaucaccauc gagcugucca 240
 acaucaagga gaacaagugc aacggcaccg acgcgaaggu gaagcugauc aaccaggagc 300
 ucgacaagua caagaacgcc gucaccgagc ugcagcugcu caugcagagc acgaccgccg 360
 ccaacaaccg cgcgcgccgc gagcugccgc gguucaugaa cuacaccug aacaacacca 420
 agaagacgaa cgugaccuc uccaagaagc gcaagcggcg cuuccugggg uuccugcucg 480
 gcguggggag cgccaucgcc uccggcaucg ccgucagcaa ggugcugcac cuggaggggc 540
 aggugaacaa gaucaagucc gccuccuga gcaccaacaa ggcgugcug ucccugagca 600
 acgggguguc cguccucacc agcaaggugc uggaccugaa gaacuaucauc gacaagcagc 660
 uccugcccau cgugaacaag caguccugcc ggaucaagaa caugcagacg gucaucgagu 720
 uccagcagaa gaacaaccgc cugcucgaga uacccggga guucagcug aacgccggcg 780
 ugaccacccc cgucuccacg ucaugcuga ccaacagcga gcugcucucc cugaucaacg 840
 acaugcccau caccaacgac cagaagaagc ugaugagcaa caacgugcag aucgugcgcc 900
 agcaguccua cagcauauug uccaucuaa aggaggaggu ccucgccuac guggugcagc 960
 ugccgcugua cggggucauc gacaccccu gcuggaagcu ccacacgagc cccugugca 1020
 ccaccaacac caaggagggc uccaacaucu gccugacgcg gaccgaccgc gggugguacu 1080
 gcgacaacgc cggcagcgug uccuucuucc cccaggccga gaccugcaag guccagagca 1140
 accggguguu cugcgacacc augaacucc ucacgcugcc gagcgaggug aaccugugca 1200
 acgucgacau cuucaacccc aaguacgacu gcaagaucau gaccuccaag accgacguga 1260

<210> 33

<211> 2044

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSV-Fdel554-574 long (GC) R2821

<400> 33

ES 2 747 762 T3

ggggcgcugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accauggagc	60
ugcccauccu caaggccaac gccaucacca ccauccuggc ggccgugacg uucugcuucg	120
ccagcuccca gaacauacc gaggaguucu accagagcac cugcuccgcc gucagcaagg	180
gcuaccuguc cgccuccgg accggguggu acacgagcgu gaucaccauc gagcugucca	240
acaucaagga gaacaaguc aacggcaccg acgcgaaggu gaagcugauc aaccaggagc	300
ucgacaagua caagaacgcc gucaccgagc ugcagcugcu caugcagagc acgaccgccg	360
ccaacaaccg cgcgcggcgc gagcugccgc gguucaugaa cuacaccug aacaacacca	420
agaagacgaa cgugaccuc uccaagaagc gcaagcggcg cuuccugggg uuccugcucg	480
gcguggggag cgccaucgcc uccggcaucg ccgucagcaa ggugcugcac cuggaggggc	540
aggugaacaa gaucaagucc gccuccuga gcaccaacaa ggcggucgug ucccugagca	600
acgggguguc cguccucacc agcaaggugc uggaccugaa gaacuacauc gacaagcagc	660
uccugcccau cgugaacaag caguccugcc ggaucaagcaa caucgagacg gucaucgagu	720
uccagcagaa gaacaaccgc cugcucgaga ucacccggga guucagcgug aacgccggcg	780
ugaccacccc cgucuccacg uacaugcuga ccaacagcga gcugcucucc cugaucaacg	840
acaugcccau caccaacgac cagaagaagc ugaugagcaa caacgugcag aucgucgcc	900
agcaguccua cagcaucaug uccaucauca aggaggaggu ccucgccuac guggugcagc	960
ugccgcugua cggggucauc gacaccccu gcuggaagcu ccacacgagc cccugugca	1020
ccaccaacac caaggagggc uccaacauu gccugacgcg gaccgaccgc gggugguacu	1080
gcgacaacgc cggcagcgug uccuucucc cccaggccga gaccugcaag guccagagca	1140
accggguguu cugcgacacc augaacucc ucacgcugcc gagcgaggug aaccugugca	1200
acgucgacau cuucaacccc aaguacgacu gcaagaucan gaccuccaag accgacguga	1260
gcuccagcgu gaucaccucc cucggcgcga ucgucagcug cuacgggaag acgaagugca	1320
ccgccagcaa caagaaccgc ggcaucauca agaccuucuc caacgggugc gacuacguga	1380
gcaacaaggc cguggacacc gucuccgug gcaacacccu guacuacgug aacaagcagg	1440
aggggaagag ccuguacguc aaggcgagc ccaucauca cuucuacgac cccucgugu	1500
ucccguccga cgaguucgac gccagcaucu cccaggugaa cgagaagauc aaccagagcc	1560
uggccuucan ccggaagucc gacgagcugc ugcaccacgu caacgccggg aagagcacga	1620
ccaacaucau gaucaccacc aucaucaucg ugaucaucgu gaucuccug ucccugaucg	1680
cggucggccu ccugcuguac ugcaaggccc gcugaggacu agugcaucac auuuuaagc	1740
aucucagccu accaugagaa uaagagaaag aaaaugaaga ucaauagcuu auucaucucu	1800

ES 2 747 762 T3

	uuuucuuuuu cgugggugua aagccaacac ccugucuaaa aaacauaaau uucuuuauc	1860
	auuuugccuc uuuucucugu gcuucaauua auaaaaaang gaaagaaccu agaucuaaaa	1920
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1980
	ugcauccccc cccccccccc cccccccccc ccccccaaag gcucuuuua gagccaccag	2040
	aaau	2044
	<210> 34	
	<211> 1558	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> RSV-N (GC) R2831	
	<400> 34	
	ggggcgugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucugc caucaagcuu accaugggcc	60
	ugagcaaggu gaagcucaac gacaccuga acaaggacca gcugcucucc agcucaagu	120
	acaccaucca ggcgagcacg ggcgacucca ucgacacccc caacuacgac guccagaagc	180
	acaucaaca gcugugcgagg augcugcuca ucaccgagga cgccaaccac aaguucaccg	240
	gccugaucgg gaugcuguac gcgaugagcc ggcucggcgg cgaggacacg aucaagauc	300
	ugcgggacgc cggguaccac gugaaggcca acggcgugga cgucaccacc caccgccagg	360
	acaucaacgg caaggagaua aaguucgagg ugcugacccu cgccuccug acgaccgaga	420
	uccagaucaa caucgagaua gagagccgga aguccuacaa gaagaugcug aaggagauag	480
	gggagguggc cccggaguac cgccacgaca gccccgacug cggcaugauc auccucugca	540
	ucgcgggccu ggucaucacc aagcugggcg cgggggaccg guccggccuc accgcggu	600
	uccgccgggc caacaacgug cugaagaacg agaugaagcg cuacaagggg cugcucccca	660
	aggacaucgc caacagcuuc uacgaggucu ucgagaagca cccccacuuc aucgacgugu	720
	ucgugcacuu cggcaucgcc caguccagca cgcggggcgg gucccgcguc gagggaucu	780
	ucgccgggcu guucaugaac gcguacggcg ccggccaggu gaugcugcgg uggggcgugc	840
	ucgccaagag cgucaagaac aucaugcugg ggcacgccuc cgugcaggcc gagauggagc	900
	agguggucga gguguacgag uacgcgcaga agcugggcgg cgaggccggg uucuaccaca	960
	uccucaacaa cccgaaggcc agccugcugu ccucaccca guucccgac uucagcagcg	1020
10	ugguccuggg gaacgccgcc ggccugggga ucaugggcga guaccgagg accccgcgga	1080

accaggaccu cuacgacgcg gccaaaggccu acgccgagca gcugaaggag aacggcguga 1140
 uacaacuacuc cgugcuggac cucaccgccg aggagcugga ggcgaucaag caccagcuga 1200
 accccaagga caacgacguc gagcucugag gacuagugca ucacauuuua aagcaucuca 1260
 gccuaccaug agaauaagag aaagaaaug aagaucaaua gcuuauucau cucuuuuucu 1320
 uuuucguugg uguaaagcca acaccuguc uaaaaaaca aaauuuucu aaucuuuug 1380
 ccucuuuuucu cugugcuuca auuaauaaaa aauggaaaga accuagaucu aaaaaaaaaa 1440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaugcauc 1500
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc aaaggcucu uucagagcca ccagaauu 1558

<210> 35

<211> 967

5 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RSV-M2-1 (GC) R2833

<400> 35

ggggcgugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accaugagcc 60
 gccggaacc cugcaaguuc gagaucgcg gccacugccu gaacgggaag cggugccacu 120
 ucuccacaa cuacuucgag uggccgcccc acgccuccu ggugcgccag aacuuaugc 180
 ugaaccggau ccucaagagc auggacaagu ccaucgacac ccugagcgag aucuccggcg 240
 ccgaggagcu ggaccgcacc gaggaguacg ccucgggggu cgugggcgug cuggagagcu 300
 acaucggguc caucaacaac aucacgaagc agagcgccug cgucgccaug uccaagcugc 360
 ucaccgagcu gaacagcgac gacaucaaga agcugcggga caacgaggag cucaacuccc 420
 ccaagaucg cguguacaac accgugauca gcuacaucga guccaaccgg aagaacaaca 480
 agcagaccu ccaccugcug aagcgccucc ccgccgacgu ccugaagaag acgaucaaga 540
 acaccugga cauccacaag agcaucacca ucaacaacc gaaggagcuc accguguccg 600
 acacgaacga ccacgcgaag aacaacgaca ccaccugagg acuagugcau cacauuuuaa 660
 agcaucucag ccuaccauga gaauaagaga aagaaauga agaucaauag cuuauucauc 720
 10 uuuuuuucu uuucguuggu guaaagccaa caccugucu aaaaaacaua aaauuuuuu 780

ES 2 747 762 T3

aucauuuugc cucuuuucuc ugugcuucaa uuaauaaaaa auggaaagaa ccuagaucua	840
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	900
aaaugcaucc cccccccccc cccccccccc ccccccccca aaggcucuuu ucagagccac	960
cagaauu	967

5 <210> 36
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 36

gcggctcggc cattttgtcc cagtcagtcc ggaggctgcg gctgcagaag taccgcctgc	60
ggagtaactg caaag	75

10 <210> 37
 <211> 24
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia tallo-bucle de histona

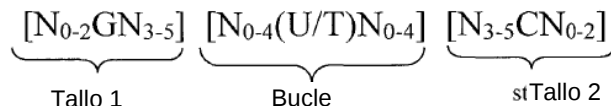
15 <400> 37

caaaggcucu uuucagagcc acca 24

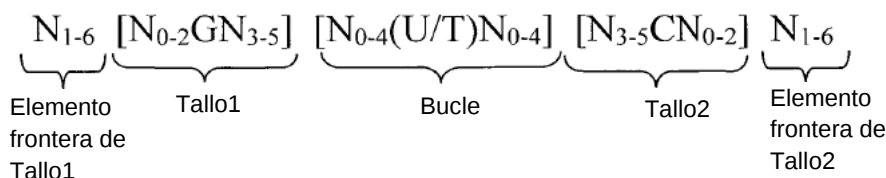
REIVINDICACIONES

1. Secuencia de ARNm que comprende una región codificante que codifica un mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV), donde los residuos aminoácido 554-574 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión F se han eliminado en el mutante de la proteína de fusión F, donde el contenido en G/C de la región codificante se ha aumentado sustituyendo al menos el 70% de los codones sustituibles en la región codificante en comparación con el contenido en G/C de la región codificante del ARNm de tipo salvaje y donde la secuencia de aminoácidos codificada de dicho ARNm enriquecido en GC no se ha modificado en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada del ARNm de tipo salvaje
2. Secuencia de ARNm según la reivindicación 1, donde la proteína de fusión F mutante se deriva de la cepa de RSV ATCC VR-26 long.
3. Secuencia de ARNm según las reivindicaciones 1 o 3, que adicionalmente comprende:
 - a) una estructura 5'-CAP,
 - b) una secuencia poli(A),
 - c) y, opcionalmente, una secuencia poli(C).
4. Secuencia de ARNm según la reivindicación 3, donde la secuencia poli(A) comprende una secuencia de 25 a 400 nucleótidos de adenosina
5. Secuencia de ARNm según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende al menos un tallo-bucle de histona.
6. Secuencia de ARNm según la reivindicación 5, donde el al menos un tallo-bucle de histona se selecciona de las siguientes fórmulas (I) o (II):

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera del tallo):



donde:

elementos frontera del tallo1 o tallo2 N_{1-6} : es una secuencia consecutiva de 1 a 6, preferiblemente de 2 a 6, más preferiblemente de 2 a 5, aún más preferiblemente de 3 a 5, más preferiblemente de 4 a 5 o de 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de entre A, U, T, G y C, o un análogo de nucleótido del mismo;

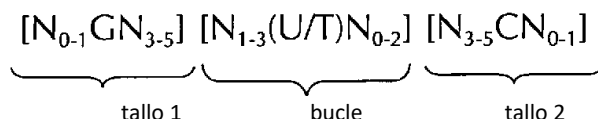
tallo1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$: es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa con el elemento tallo2 y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, preferiblemente de 0 a 1, más preferiblemente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, preferiblemente de 4 a 5, más preferiblemente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo, y donde G es guanósina o un análogo del mismo, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, siempre que su citidina de nucleótido complementario en tallo2 se reemplace por guanósina;

secuencia bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$: se ubica entre los elementos tallo1 y tallo2 y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, más preferiblemente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independiente de otra secuencia consecutiva de 0 a 4, preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1 a 2 N, donde cada N se selecciona de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde U/T representa uridina, u opcionalmente timidina;

5 tallo2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$: es complementaria inversa o complementaria parcialmente inversa al elemento tallo1 y es una secuencia consecutiva de 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, preferiblemente de 4 a 5, más preferiblemente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; siendo N_{0-2} una secuencia consecutiva de 0 a 2, preferiblemente de 0 a 1, más preferiblemente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G o C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma siempre que su guanosina de nucleósido complementario en tallo1 se reemplace por citidina;

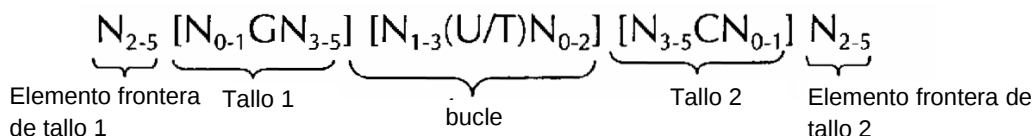
10 donde tallo1 y tallo2 son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia inversa complementaria, donde el apareamiento de bases puede ocurrir entre tallo1 y tallo2 o formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, donde un apareamiento de bases incompleto puede ocurrir entre tallo1 y tallo2.

15 7. Secuencia de ARNm según la reivindicación 6, donde el al menos un tallo-bucle de histona se selecciona de al menos una de las siguientes fórmulas (Ia) o (IIa):



fórmula (Ia) (secuencia de tallo-bucle sin elementos frontera de tallo)

20



25

fórmula (IIa) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo)

8. Secuencia de ARNm según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende un elemento 3'-UTR.

30 9. Secuencia de ARNm según la reivindicación 8, donde el al menos un elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen que proporciona un ARNm estable, donde el elemento 3'UTR preferentemente comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico derivada de una 3'UTR de un gen seleccionado del grupo consistente en un gen de albúmina, un gen de α -globina, un gen de β -globina, un gen de tirosina-hidroxilasa, un gen de lipoxigenasa y un gen de colágeno alfa, donde, con especial preferencia, el elemento 3'-UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico derivado de una 3'UTR de un gen de α -globina, preferentemente comprendiendo la secuencia de ARN correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 29.

40 10. Secuencia de ARNm según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde la secuencia de ARNm comprende, preferentemente en la dirección 5' a 3':

- a) una estructura 5'-CAP, preferentemente m7GpppN;
- b) una región codificante que codifica para la proteína de fusión F mutante del virus respiratorio sincitial (RSV);
- 45 c) un elemento 3'-UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de un gen de alfa globina, preferentemente que comprende la secuencia de ARN correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 29,
- d) una secuencia poli(A), que preferentemente comprende 64 adenosinas;
- e) una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y

- f) un tallo-bucle de histona, que preferentemente comprende la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.
- 5 **11.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 8, donde el al menos un elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 3'UTR de un gen de albúmina humano.
- 12.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 11, donde el elemento 3'UTR se deriva de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 25, preferentemente de una secuencia de ARN correspondiente.
- 10 **13.** Secuencia de ARNm según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que además comprende un elemento 5'-UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP, preferentemente de una secuencia de ARN correspondiente, preferentemente sin el motivo 5'TOP.
- 15 **14.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 13, donde el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP que codifica una proteína ribosómica, preferentemente de una secuencia de ARN correspondiente, preferentemente sin el motivo 5'TOP.
- 20 **15.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 14, donde el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP que codifica una proteína ribosómica Large (RPL), preferentemente sin el motivo 5'TOP y con mayor preferencia que comprende o consiste en una secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 23.
- 16.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 15, donde la secuencia de ARNm comprende, preferentemente en la dirección 5' a 3':
- 25 a) una estructura 5'-CAP,
b) un elemento 5'-UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'-UTR de un gen TOP, preferentemente que comprende o consiste en la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 23,
c) una región codificante que codifica el mutante de la proteína de fusión F del virus respiratorio sincitial (RSV),
30 d) un elemento 3'UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de un gen que proporciona un ARNm estable, preferentemente que comprende o consiste en la secuencia de ARN correspondiente a una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 18,
e) una secuencia poli(A) que preferentemente comprende 64 adenosinas;
f) una secuencia poli(C), que preferentemente comprende 30 citosinas; y
35 g) un tallo-bucle de histona, que preferentemente comprende la secuencia de ARN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 30.
- 17.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 16, donde la secuencia de ARNm comprende la secuencia de ARN de acuerdo con la SEQ ID NO: 33.
- 40 **18.** Secuencia de ARNm según las reivindicaciones 1 a 17, donde la secuencia de ARNm está asociada a o complejada con un compuesto catiónico o policatiónico o un portador polimérico, opcionalmente en una proporción en peso seleccionada de un intervalo de 6:1 (p/p) a 0,25:1 (p/p) ARNm:compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico; u opcionalmente en una proporción nitrógeno/fosfato entre el ARNm y el compuesto catiónico o policatiónico y/o un portador polimérico en el intervalo de 0,1-10.
- 45 **19.** Secuencia de ARNm según la reivindicación 18, donde la secuencia de ARNm está asociada a o complejada con una proteína o un péptido catiónico, preferentemente protamina, o con un lípido catiónico.
- 20.** Composición que comprende una pluralidad o más de una de las secuencias de ARNm, en cada caso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Composición farmacéutica que comprende una secuencia de ARNm como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 o una composición como se define según la reivindicación 20 y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, donde la secuencia de ARNm está complejada al menos parcialmente con un compuesto catiónico o policatiónico y/o con un portador polimérico, preferentemente proteínas o péptidos catiónicos y con total preferencia con protamina.
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, donde la proporción entre el ARNm complejado y el ARNm libre se selecciona de un intervalo de 5:1 (p/p) a 1:10 (p/p).
- 10 24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, para su uso como una vacuna.
25. Kit o kit de partes que comprende la secuencia de ARNm como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, composición como se define según la reivindicación 20, composición farmacéutica como se define según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 y, opcionalmente, instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación de los componentes.
- 15 26. Secuencia de ARNm como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, composición como se define según la reivindicación 20, composición farmacéutica como se define según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 y kit o kit de partes como se define según la reivindicación 25, para su uso como un medicamento.
- 20 27. Secuencia de ARNm como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, composición como se define según la reivindicación 20, composición farmacéutica como se define según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 y kit o kit de partes como se define según la reivindicación 25 para su uso en el tratamiento o la profilaxis de infecciones por RSV.
- 25 28. Secuencia de ARNm, composición, composición farmacéutica y kit o kit de partes para su uso según la reivindicación 27, donde el tratamiento se combina con la administración de inmuno-globulina de RSV, en particular Palivizumab.

RSV-F long (GC) R1691

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAGCUGCCCAUCCUCAAGGCCAACGCCAUCACCACCAUCCUG
GCGGCCGUGACGUUCUGCUUCGCCAGCUCUCCAGAACAUACCCGAGGAGUUCUACCAGAGC
ACCUGCUCGCCCGUCAGCAAGGGCUACCUGUCCGCCUCCGGACCGGGUGGUACACGAGC
GUGAUCACCAUCGAGCUGUCCAACAUCAAGGAGAACAAGUGCAACGGCACCGACGCGAAG
GUGAAGCUGAUCAACCAGGAGCUCGACAAGUACAAGAAGCCGUCACCGAGCUGCAGCUG
CUCAUGCAGAGCACGACCGCCGCCAACAAACCGCGCGGGCGGAGCUGCCGCGGUUCAUG
AACUACACCCUGAACAAACACCAAGAAGACGAACGUGACCCUCUCCAAGAAGCGCAAGCGG
CGCUUCCUGGGGUUCCUGCUCGGCGUGGGGAGCGCCAUCGCCUCCGGCAUCGCCGUCAGC
AAGGUGCUGCACCUGGAGGGCGAGGUGAACAAAGAUCAAGUCCGCCUCCUGAGCACC AAC
AAGGCGGUGCUGUCCUGAGCAACGGGGUGUCCGUCCUACCCAGCAAGGUGCUGGACCUG
AAGAACUACAUCGACAAGCAGCUCUCCGCCAUCGUGAACAAAGCAGUCCUGCCGGAUCAGC
AACAU CGAGACGGUCAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUCGAGAUACCCCGG
GAGUUCAGCGUGAACGCCGGCGUGACCACCCCGUCUCCACGUACAUGCUGACCAACAGC
GAGCUGCUCUCCUGAUCAACGACAUGCCCAUCACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGAGC
AACACGUGCAGAU CGUGCGCCAGCAGUCCUACAGCAUCAUGUCCAUCAUCAAGGAGGAG
GUCCUCGCCUACGUGGUGCAGCUGCCGCUGUACGGGGUCAUCGACACCCCGUGCUGGAAG
CUCCACACGAGCCCCUGUGCACCACCAACACCAAGGAGGGCUCCAACAUCUGCCUGACG
CGGACCGACCGCGGGUGGUACUGCGACAACGCCGGCAGCGUGUCCUUCUUCUCCCCAGGCC
GAGACCUGCAAGGUCCAGAGCAACCGGGUGUUCUGCGACACCAUGAACUCCUUCACGCUG
CCGAGCGAGGUGAACCUUGUGCAACGUCGACAUCUUAACCCCAAGUACGACUGCAAGAUC
AUGACCUCCAAGACCGACGUGAGCUCAGCGUGAUCACCUCUCCUGGGCGGAUCGUCAGC
UGCUCGGAAGACGAAGUGCACCGCCAGCAACAAGAACCGCGGAUCAUCAAGACCUUC
UCCAACGGGUGCGACUACGUGAGCAACAAGGGCGUGGACACCGUCUCCGUGGGCAACACC
CUGUACUACGUGAACAAAGCAGGAGGGGAAGAGCCUGUACGUCAAGGGCGAGCCCAUCAUC
AACUUCUACGACCCCCUCGUGUCCCGUCCGACGAGUUCGACGCCAGCAUCUCCAGGUG
AACGAGAAGAUCAACCAGAGCCUGGCCUUAUCCGGAAGUCCGACGAGCUGCUGCACCAC
GUCAACGCCGGGAAGAGCACGACCAACAUAUGAUCACCACCAUCAUCAUCGUGAUC AUC
GUGAUCUCCUGUCCUGAUCGCGGUGCGGCCUCCUGCUGUACUGCAAGGCCCGCAGCACG
CCCGUGACCCUCUCCAAGGACCAGCUGAGCGGGAUCAACAACAUCGCCUUCUCCAACUGA
GGACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCUCCCUCCU
GCACCGAGAUUAAUAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGC
UCUUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 1

RSV-F long (GC) R2510

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGAGC
 UGCCCAUCCUCAAGGCCAACGCCAUCACCACCAUCCUGGCGGCCGUGACGUUCUGCUUCC
 CCAGCUCCCAGAACAUACCCGAGGAGUUCUACCAGAGCACCUGCUCGCGCCGUCAGCAAGG
 GCUACCUGUCCGCCCUCGGACCGGGUGGUACACGAGCGUGAUCACCAUCGAGCUGUCCA
 ACAUCAAGGAGAACAGUGCAACGGCACCGACGCGAAGGUGAAGCUGAUAACCAGGAGC
 UCGACAAGUACAAGAACGCCGUCACCGAGCUGCAGCUGCUAUGCAGAGCACGACCGCCG
 CCAACAACCGCGCGCGCGCGAGCUGCCGCGGUUCAUGAACUACACCCUGAACAAACACCA
 AGAAGACGAACGUGACCCUCUCCAAGAAGCGCAAGCGGCGCUUCCUGGGGUUCCUGCUCG
 GCGUGGGGAGCGCCAUCGCCUCCGGCAUCGCCGUCAGCAAGGUGCUGCACCUGGAGGGCG
 AGGUGAACAGAUAAGUCCGCCUCCUGAGCACCAACAAGGCGGUCGUGUCCUGAGCA
 ACGGGGUGUCCGUCCUACCCAGCAAGGUGCUGGACCUGAAGAACUACAUCGACAAGCAGC
 UCCUGCCCCAUCGUGAACAAAGCAGUCCUGCCGGAUCAGCAACAUCGAGACGGUCAUCGAGU
 UCCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUCGAGAUACCCGGGAGUUCAGCGUGAACGCCGGCG
 UGACCACCCCGUCUCCACGUACAUGCUGACCAACAGCGAGCUGCUCUCCUGAUAACG
 ACAUGCCCCAUCACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGAGCAACAACGUGCAGAUCCGUGCGCC
 AGCAGUCCUACAGCAUCAUGUCCAUAUCAAGGAGGAGGUCCUCGCCUACGUGGUGCAGC
 UGCCGUGUACGGGGUCAUCGACACCCCGUGCUGGAAGCUCCACACGAGCCCCUGUGCA
 CCACCAACACCAAGGAGGGCUCCAACAUUGCCUGACGCGGACCGACCGCGGGUGGUACU
 GCGACAACGCCGGCAGCGUGUCCUUCUCCCCAGGCCGAGACCUGCAAGGUCCAGAGCA
 ACCGGGUGUUCUGCGACACCAUGAACUCCUACGCUGCCGAGCGAGGUGAACUGUGCA
 ACGUCGACAUCUUAACCCCAAGUACGACUGCAAGAUAUGACCUCCAAGACCGACGUGA
 GCUCCAGCGUGAUCACCUCUCCGCGCGAUCGUCAGCUGCUACGGGAAGACGAAGUGCA
 CCGCCAGCAACAAGAACCGCGGCAUCAUCAAGACCUUCUCCAACGGGUGCGACUACGUGA
 GCAACAAGGGCGUGGACACCGUCUCCGUGGGCAACACCCUGUACUACGUGAACAAAGCAGG
 AGGGGAAGAGCCUGUACGUAAGGGCGAGCCCAUCAUCAACUUCUACGACCCUCCUGUGU
 UCCCGUCCGACGAGUUCGACGCCAGCAUCUCCAGGUGAACGAGAAGAUCAACCAGAGCC
 UGGCCUUAUCCGGAAGUCCGACGAGCUGCUGCACCACGUAACGCCGGGAAGAGCACGA
 CCAACAUAUGAUAACCACCAUCAUAUCGUGAUAUCGUGAUCCUCCUGUCCUGAUCG
 CGGUCGGCCUCCUGCUGUACUGCAAGGCCCGCAGCACGCCCUGACCCUCUCCAAGGACC
 AGCUGAGCGGGAUCAACAACAUCGCCUUCUCCAACUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAA
 AGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUC
 UCUUUUUUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUUUA
 AUCAUUUUGCCUCUUUUUCUGUGCUUCAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUGAUCUA
 AA
 AAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGCCAC
 CAGAAUU

Fig. 2

RSV-Fdel554-574 long (GC) R2821

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGAGC
 UGCCCCAUCCUCAAGGCCAACGCCAUCACCACCAUCCUGGCGGCCGUGACGUUCUGCUUCG
 CCAGCUCCCAAGAACAUACCCGAGGAGUUCUACCAGAGCACCUGCUCGCGCCGUCAGCAAGG
 GCUACCUGUCCGCCCCUCCGGACCGGGUGGUACACGAGCGUGAUCACCAUCGAGCUGUCCA
 ACAUCAAGGAGAACAGUGCAACGGCACCGACGCGAAGGUGAAGCUGAUCACCAAGGAGC
 UCGACAAGUACAAGAACGCCGUCACCAGCUGCAGCUGCUCAUGCAGAGCACGACCGCCG
 CCAACAACCGCGCGCGGCGGAGCUGCCGCGGUUCAUGAACUACACCCUGAACAAACACCA
 AGAAGACGAACGUGACCCUUCUCCAAGAAGCGCAAGCGGCGCUUCCUGGGGUUCCUGCUUCG
 GCGUGGGGAGCGCCAUCGCCUCCGGCAUCGCCGUCAGCAAGGUGCUGCACCUGGAGGGCG
 AGGUGAACAGAUAAGUCCGCCUCCUGAGCACCAACAAGGCGGUCGUGUCCCUAGCA
 ACGGGGUGUCCGUCCUACACAGCAAGGUGCUGGACCUGAAGAUAUAUCGACAAGCAGC
 UCCUGCCCCAUCGUGAACAAAGCAGUCCUGCCGGAUCAGCAACAUCGAGACGGUCAUCGAGU
 UCCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUCGAGAUACCCGGGAGUUCAGCGUGAACGCCGGCG
 UGACCACCCCCGUCUCCACGUACAUGCUGACCAACAGCGAGCUGCUCUCCUGAUAACG
 ACAUGCCCCAUCACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGAGCAACAACGUGCAGAUUGGCGCC
 AGCAGUCCUACAGCAUCAUGUCCAUAUCAAGGAGGAGGUCCUGCCUACGUGGUGCAGC
 UGCCGCGUACGGGGUCAUCGACACCCCCUGCUGGAAGCUCCACAGAGCCCCCUGUGCA
 CCACCAACACCAAGGAGGGCUCCAACUUGCCUGACGCGGACCGACCGCGGGUGGUACU
 GCGACAACGCCGGCAGCGUGUCCUUCUCCCCAGGCCGAGACCUGCAAGGUCCAGAGCA
 ACCGGGUGUUCUGCGACACCAUGAACUCCUACGCUGCCGAGCGAGGUGAACCUUGUGCA
 ACGUCGACAUCUUAACCCCAAGUACGACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCGACGUGA
 GCUCCAGCGUGAUAACCUCCUCCGCGCGAUCGUCAGCUGCUACGGGAAGACGAAGUGCA
 CCGCCAGCAACAAGAACC GCGGCAUCAUCAAGACC UUCUCCAACGGGUGCGACUACGUGA
 GCAACAAGGGCGUGGACACCGUCUCCGUGGGCAACACCCUGUACUACGUGAACCAAGCAGG
 AGGGGAAGAGCCUGUACGUCAAGGGCGAGCCCAUCAUCAACUUCUACGACCCCCUCGUGU
 UCCCGUCCGACGAGUUCGACGCCAGCAUCUCCAGGUGAACGAGAAGAUCAACCAGAGCC
 UGGCCUUAUCCGGAAGUCCGACGAGCUGCUGCACCACGUCAACGCCGGGAAGAGCACGA
 CCAACAUAUGAUAACCAUAUCAUAUCGUGAUAUCGUGAUAUCCUCCUGUCCUGAUCG
 CGGUCGGCCUCCUGCUGUACUGCAAGGCCCGCUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGC
 AUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCU
 UUUUUCUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUCUUUAUC
 AUUUUGCCUCUUUUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAA
 AA
 UGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCAG
 AAUU

Fig. 3

RSV-N (GC) R2831

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGCCC
 UGAGCAAGGUGAAGCUCAACGACACCCUGAACAAAGGACCAGCUGCUCUCCAGCUCCAAGU
 ACACCAUCCAGCGCAGCACGGGCGACUCCAUCGACACCCCCAACUACGACGUCCAGAAGC
 ACAUCAACAAGCUGUGCGGGAUGCUGCUCAUCACCGAGGACGCCAACACAAGUUCACCG
 GCCUGAUCGGGAUGCUGUACGCGAUGAGCCGGCUCGGCCGCGAGGACACGAUCAAGAUGC
 UGCGGGACGCCGGGUACACGUGAAGGCCAACGGCGUGGACGUCACCACCCACCGCCAGG
 ACAUCAACGGCAAGGAGAUGAAGUUCGAGGUGCUGACCCUCGCCUCCUGACGACCGAGA
 UCCAGAUCAACAUCGAGAUCCGAGAGCCGGAAGUCCUACAAGAAGAUGCUGAAGGAGAUGG
 GGGAGGUGGCCCCGGAGUACCGCCACGACAGCCCCGACUGCGGCAUGAUAUCCUCUGCA
 UCGCGGCCCCUGGUCAUCACCAAGCUGGCCGCCGGGGACCGGUCCGGCCUACCGCGGUGA
 UCCGCCGGGCCAACAAACGUGCUGAAGAACGAGAUGAAGCGCUACAAGGGGCUGUCCCCA
 AGGACAUCGCCAACAGCUUCUACGAGGUCUUCGAGAAGCACCCCCACUUAUCGACGUGU
 UCGUGCACUUCGGCAUCGCCCAGUCCAGCACGCGGGGCGGGUCCCGCGUCGAGGGCAUCU
 UCGCCGGGCUGUUAUGAACGCGUACGGCGCCGGCCAGGUGAUGCUGCGGUGGGGCGUGC
 UCGCCAAGAGCGUCAAGAACAUAUGCUGGGGCACGCCUCCGUGCAGGCCGAGAUGGAGC
 AGGUGGUCGAGGUGUACGAGUACGCGCAGAAGCUGGGCGGCGAGGCCGGGUUCUACCACA
 UCCUCAACAACCCGAAGGCCAGCCUGCUGUCCUCACCCAGUUCCCGCACUUCAGCAGCG
 UGGUCCUGGGGAACGCCGCCGGCCUGGGGAUCAUGGGCGAGUACCGCGGGACCCCGCGGA
 ACCAGGACCUCUACGACGCGGCCAAGGCCUACGCCGAGCAGCUGAAGGAGAACGGCGUGA
 UCAACUACUCCGUGCUGGACCUCACCGCCGAGGAGCUGGAGGCGAUAAGCACCAGCUGA
 ACCCCAAGGACAACGACGUCGAGCUCUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCA
 GCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUCU
 UUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUCUUUAUCAUUUUG
 CCUCUUUUCUCUGUGCUUCAUUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAA
 AAUGCAUC
 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 4

RSV-M₂₋₁ (GC) R2833

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGAGCC
GCCGGAACCCUGCAAGUUCGAGAUCCGCGGCCACUGCCUGAACGGGAAGCGGUGCCACU
UCUCCCACAACUACUUCGAGUGGCCGCCCCACGCCUCCUGGUGCGCCAGAACUUCAUGC
UGAACCGGAUCCUCAAGAGCAUGGACAAGUCCAUCGACACCCUGAGCGAGAUCUCCGGCG
CCGCGGAGCUGGACCGCACCGAGGAGUACGCCUUCGGGGUCGUGGGCGUGCUGGAGAGCU
ACAUCGGGUCCAUCAACAACAUCACGAAGCAGAGCGCCUGCGUCGCCAUGUCCAAGCUGC
UCACCGAGCUGAACAGCGACGACAUCAAGAAGCUGCGGGACAACGAGGAGCUAACUCCC
CCAAGAUCGCGUGUACAACACCGUGAUCAGCUACAUCGAGUCCAACCGGAAGAACAACA
AGCAGACCAUCCACCUGCUGAAGCGCCUCCCCGCCGACGUCCUGAAGAAGACGAUCAAGA
ACACCCUGGACAUCCACAAGAGCAUCACCAUCAACAACCCGAAGGAGCUCACCGUGUCCG
ACACGAACGACCACGCGAAGAACAACGACACCACCUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAA
AGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAAGAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUC
UCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUUUA
AUCAUUUUGCCUCUUUUUCUGUGCUUCAUUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUA
AAA
AAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGCCAC
CAGAAUU

Fig. 5

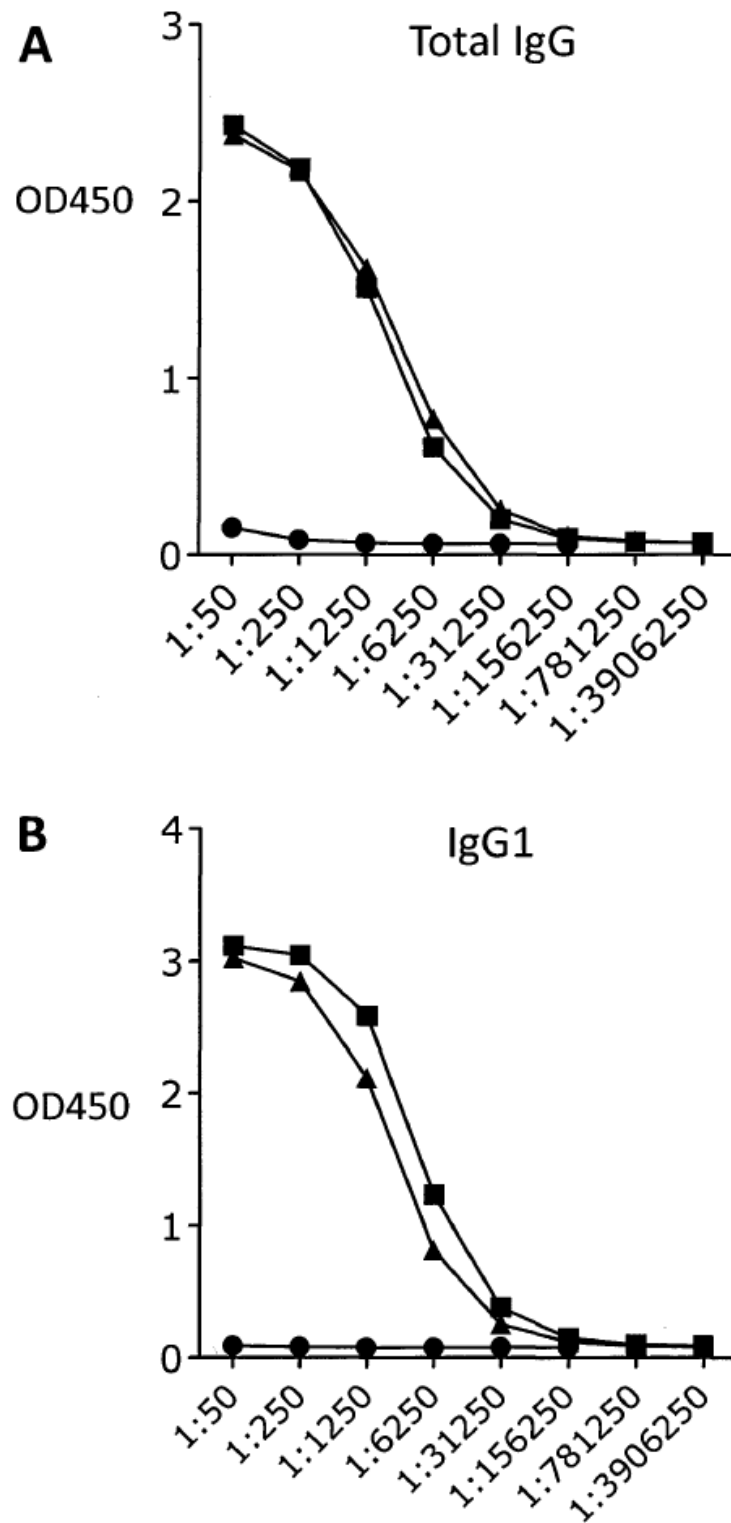


Fig. 6

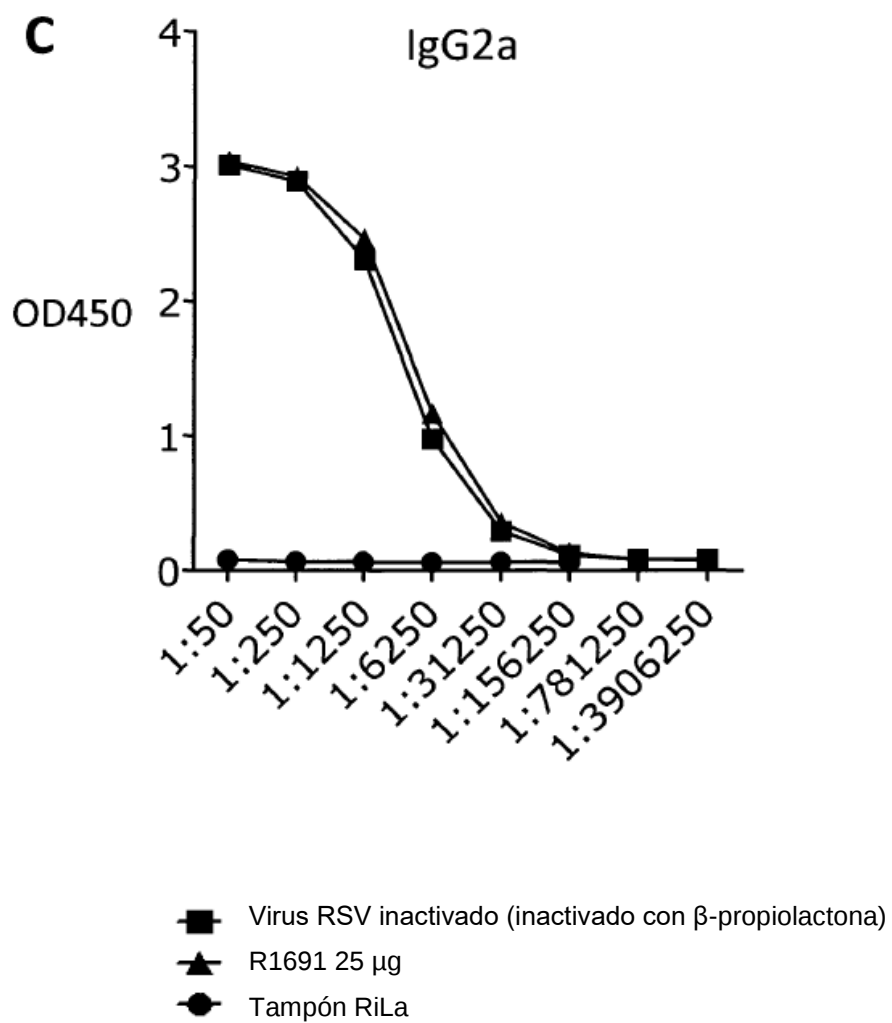


Fig. 6 (continuación)

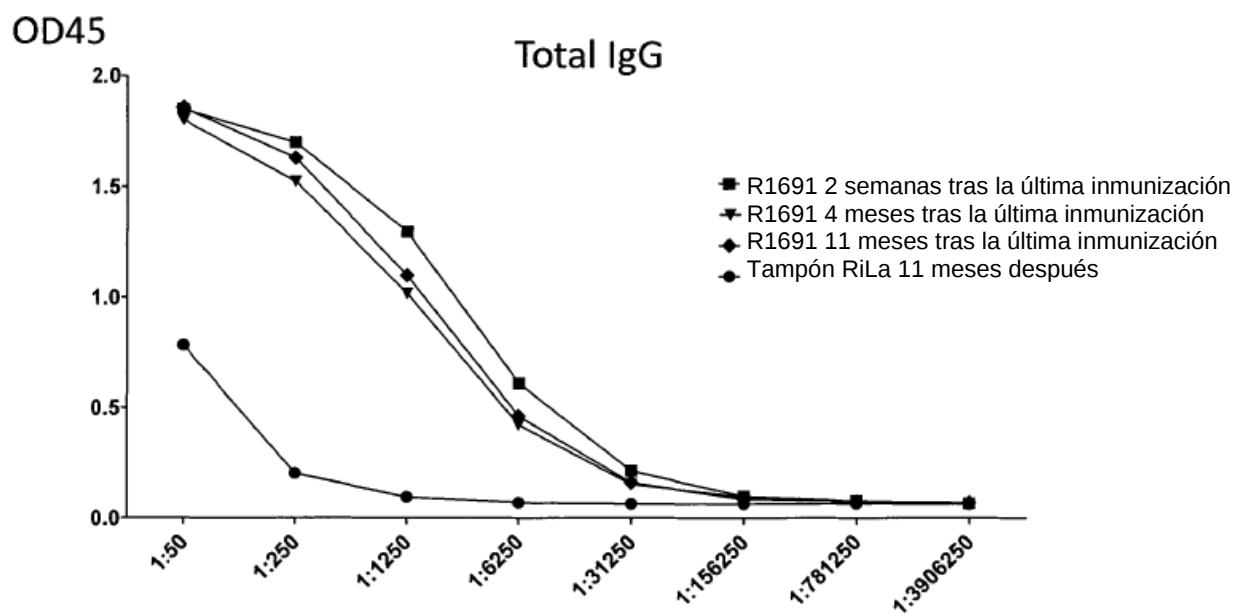


Fig. 7

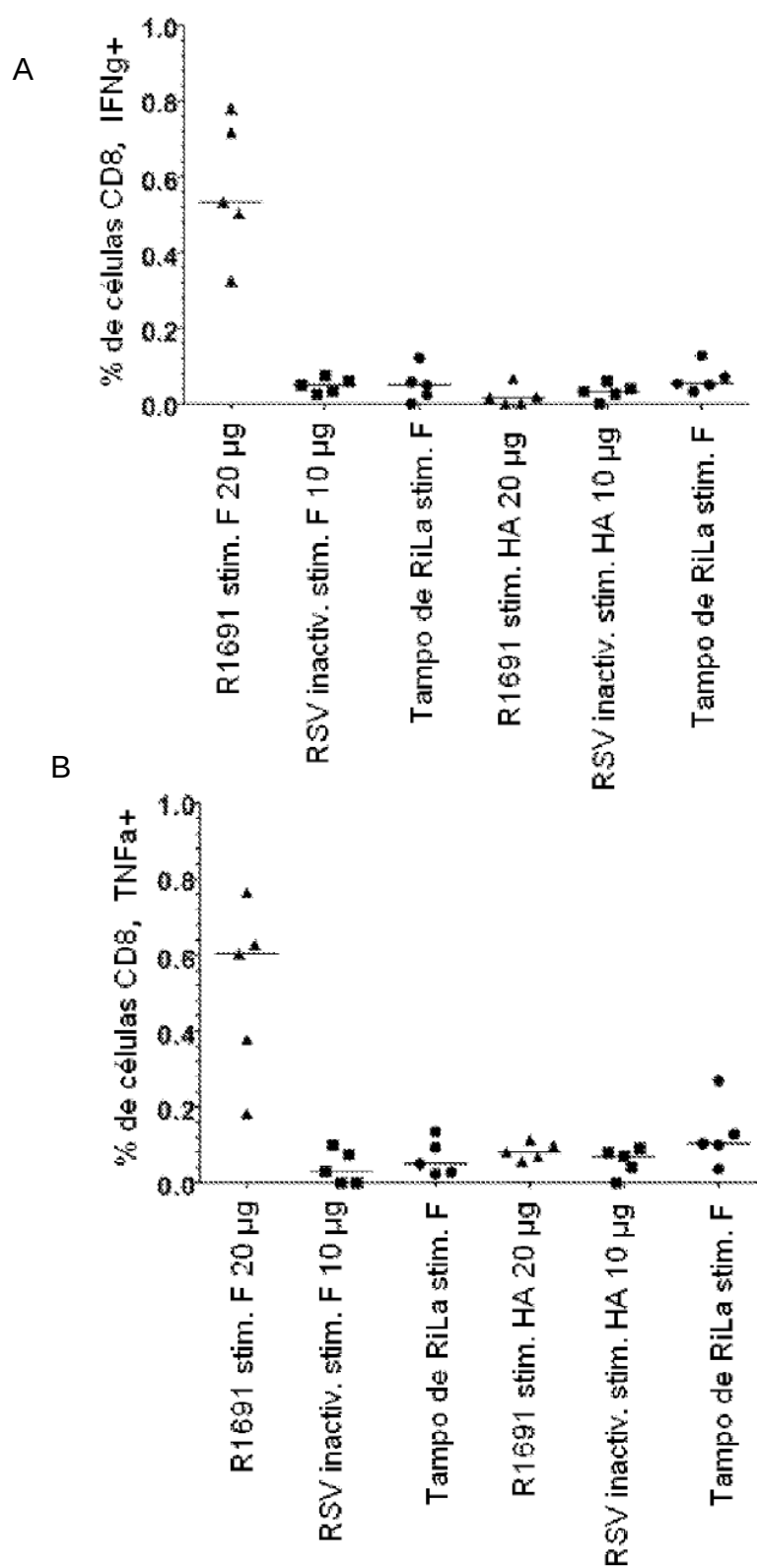


Fig. 8

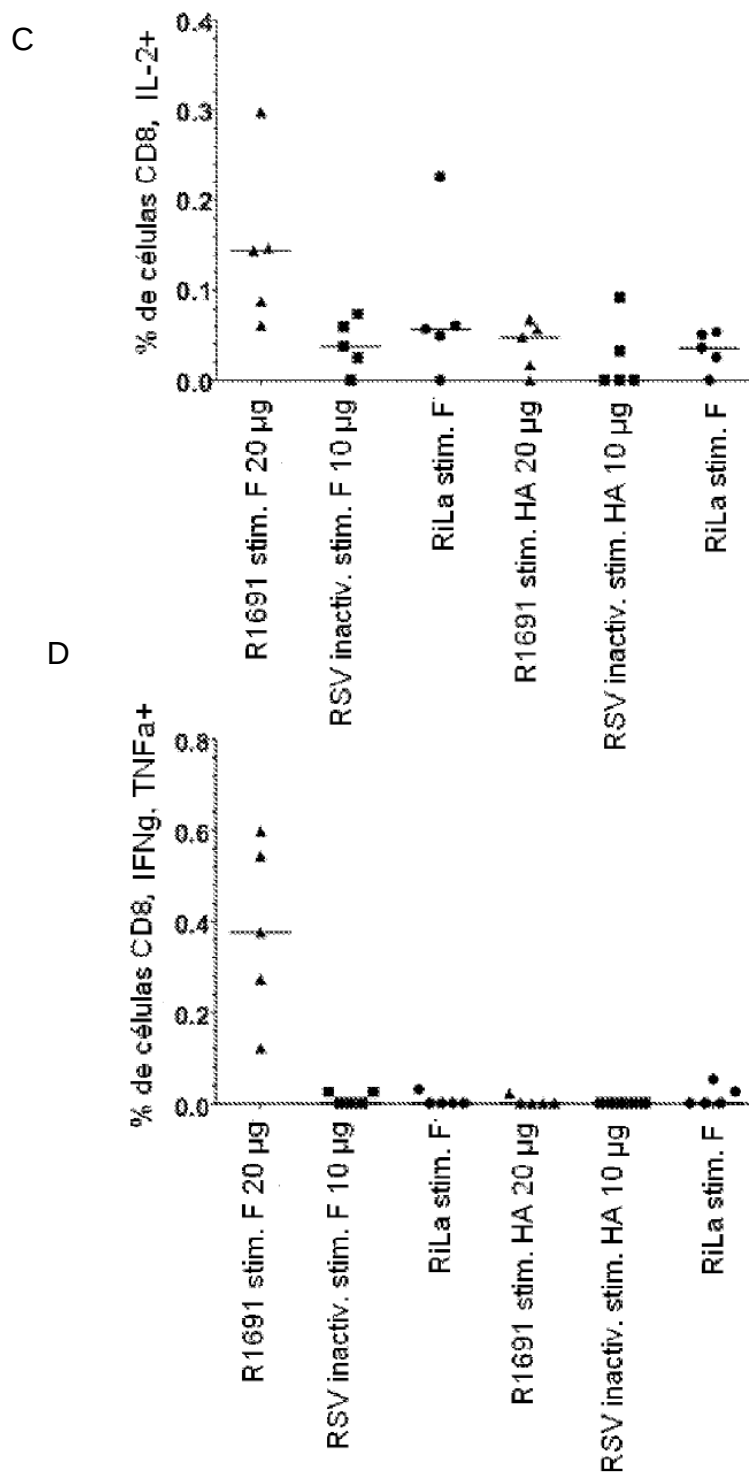


Fig. 8
(continuación)

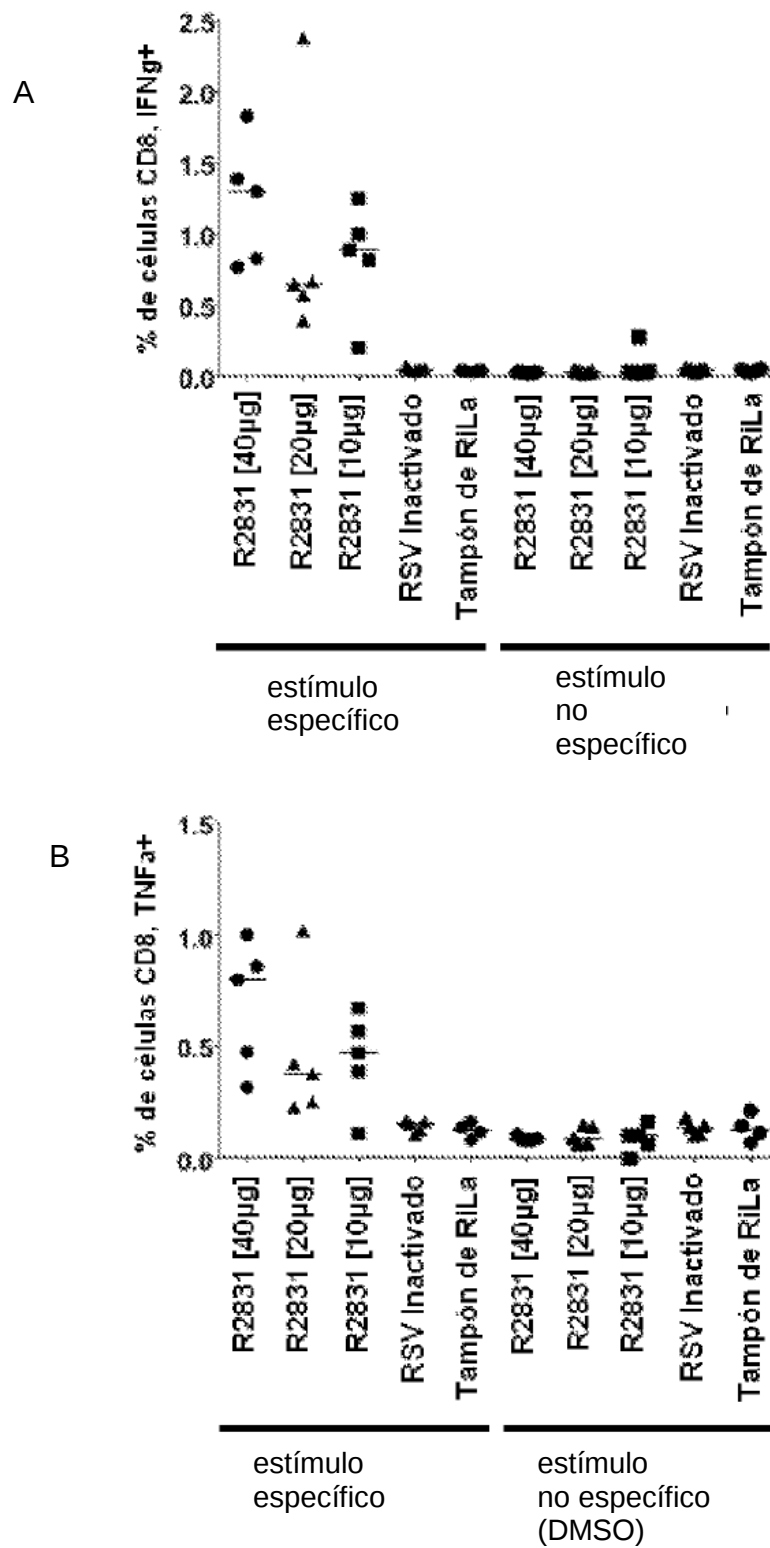


Fig. 9

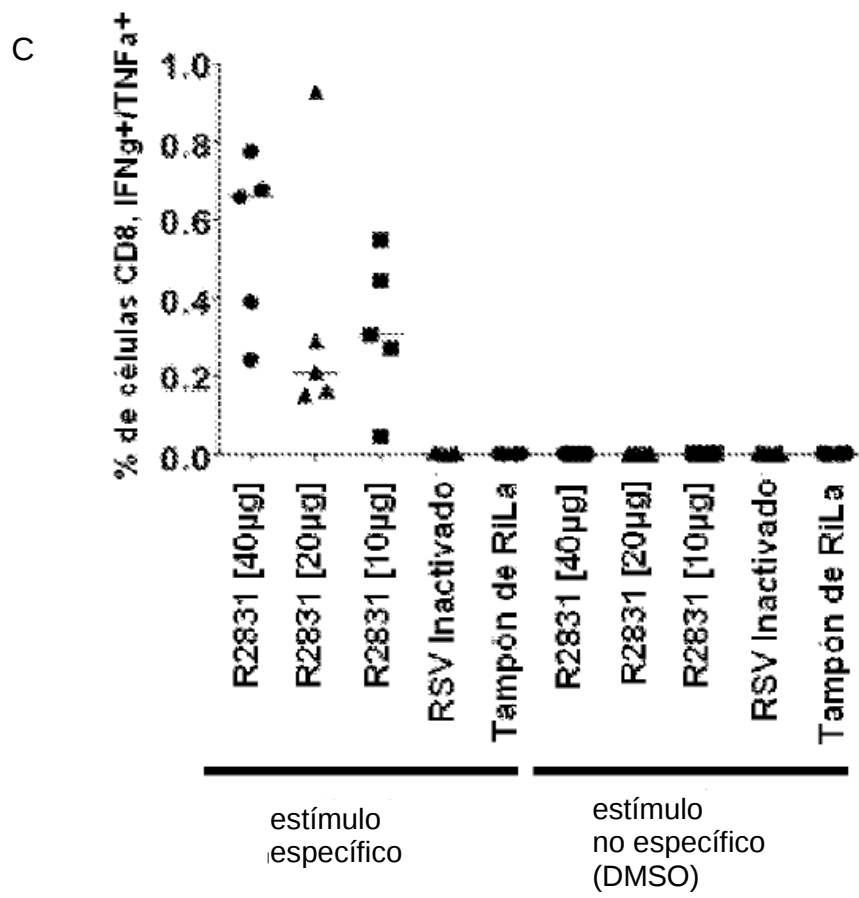


Fig. 9
(continuación)

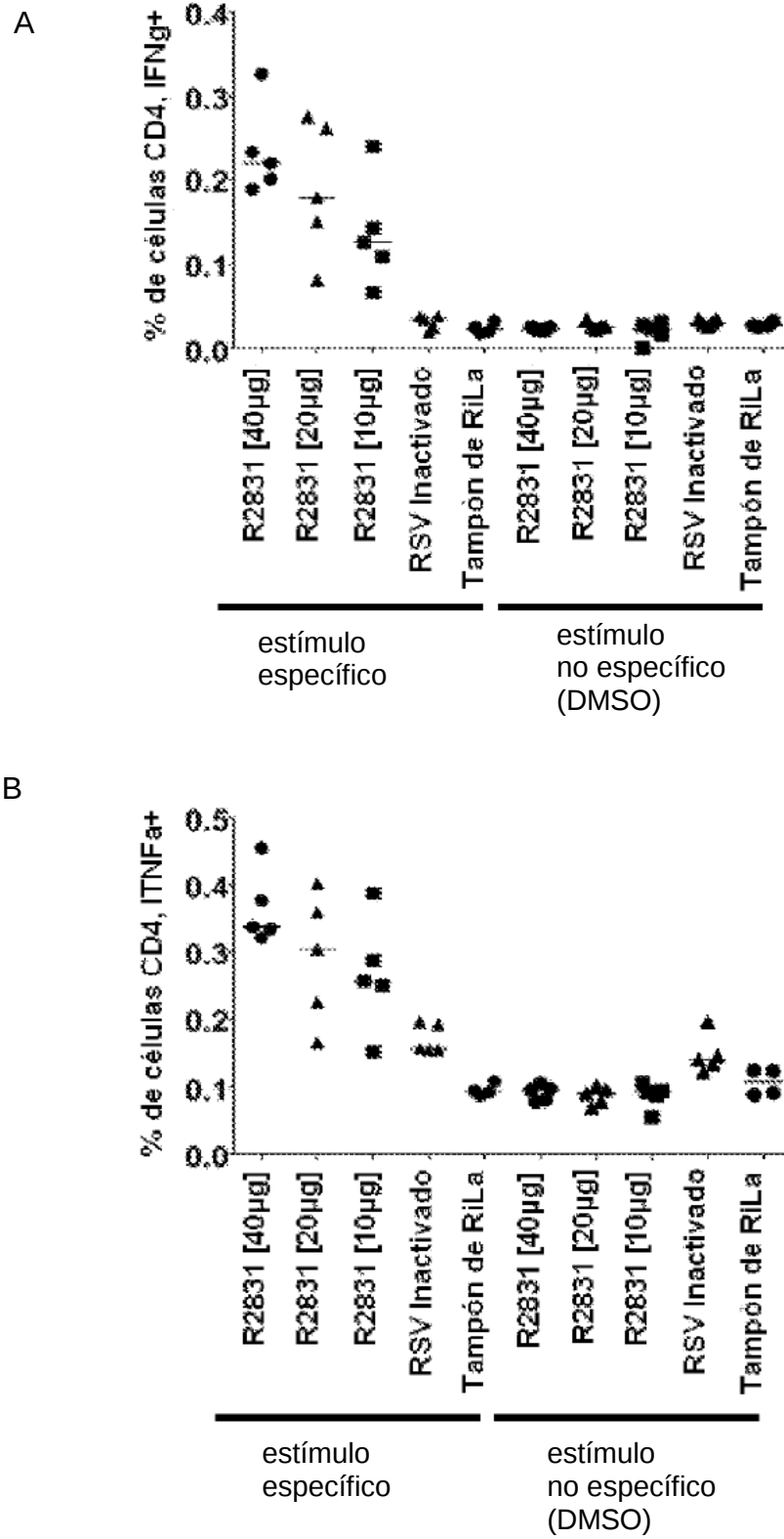


Fig. 10

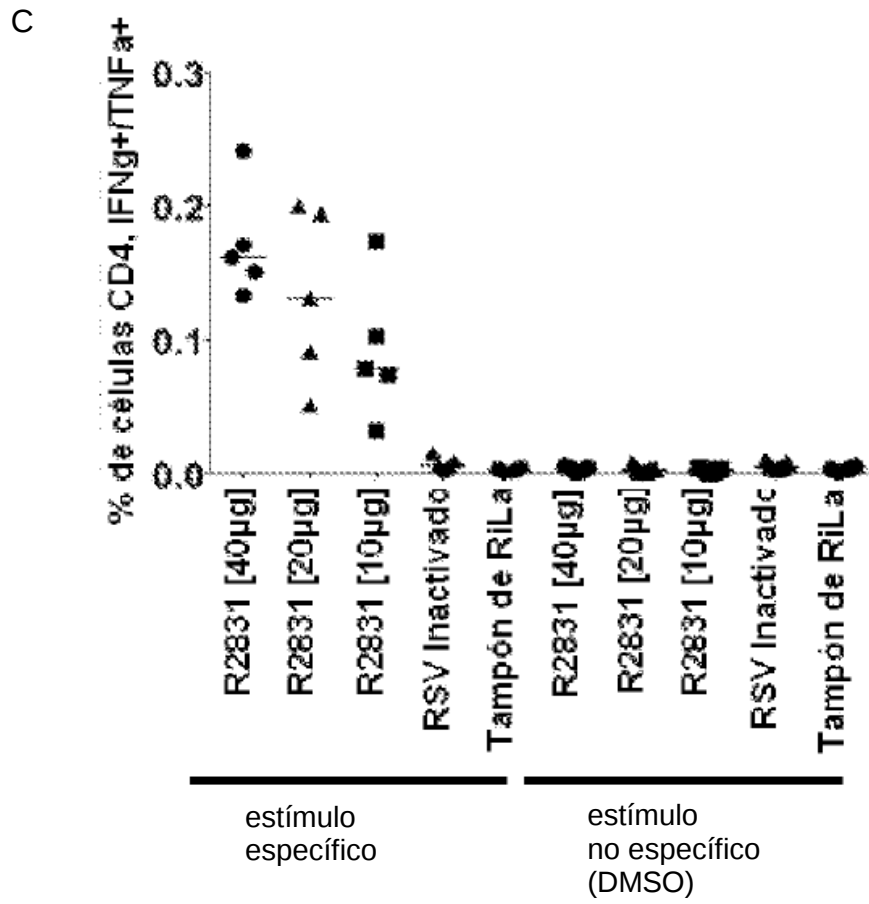


Fig. 10
(continuación)

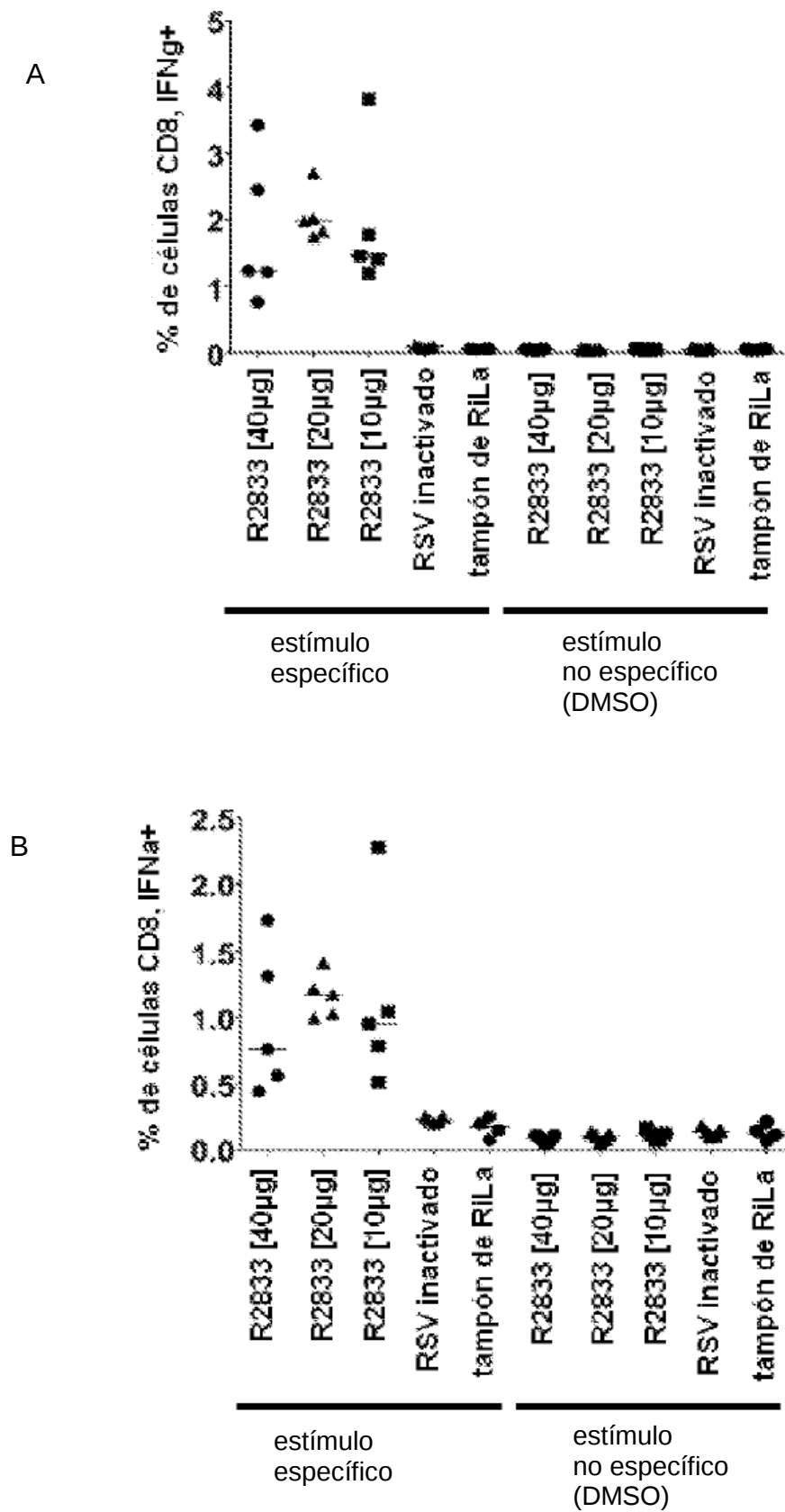


Fig. 11

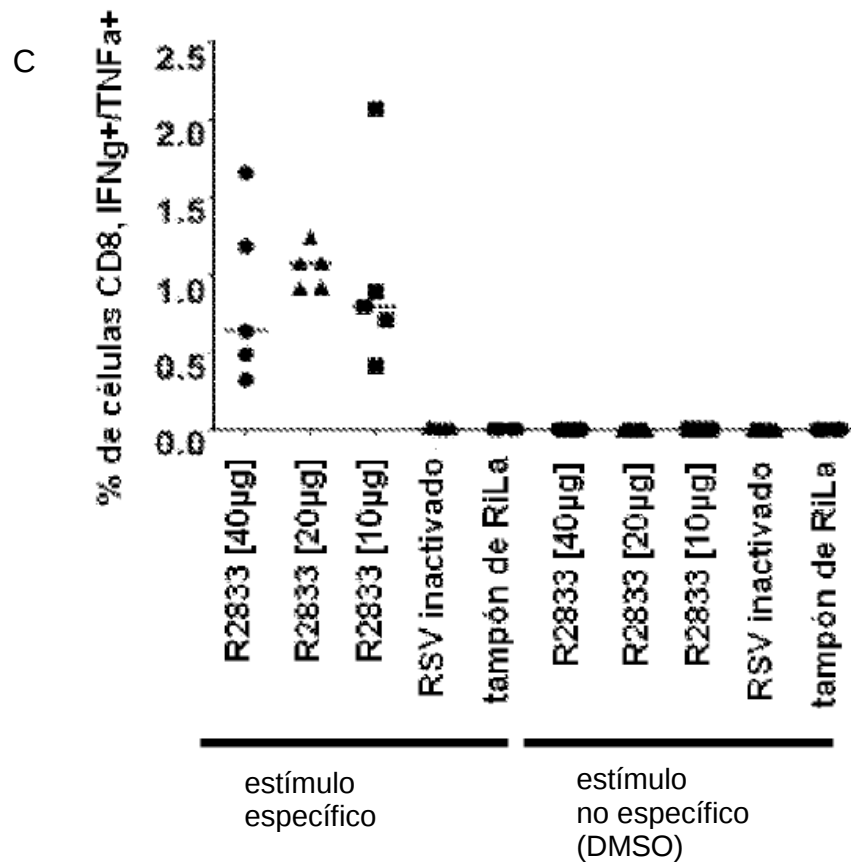
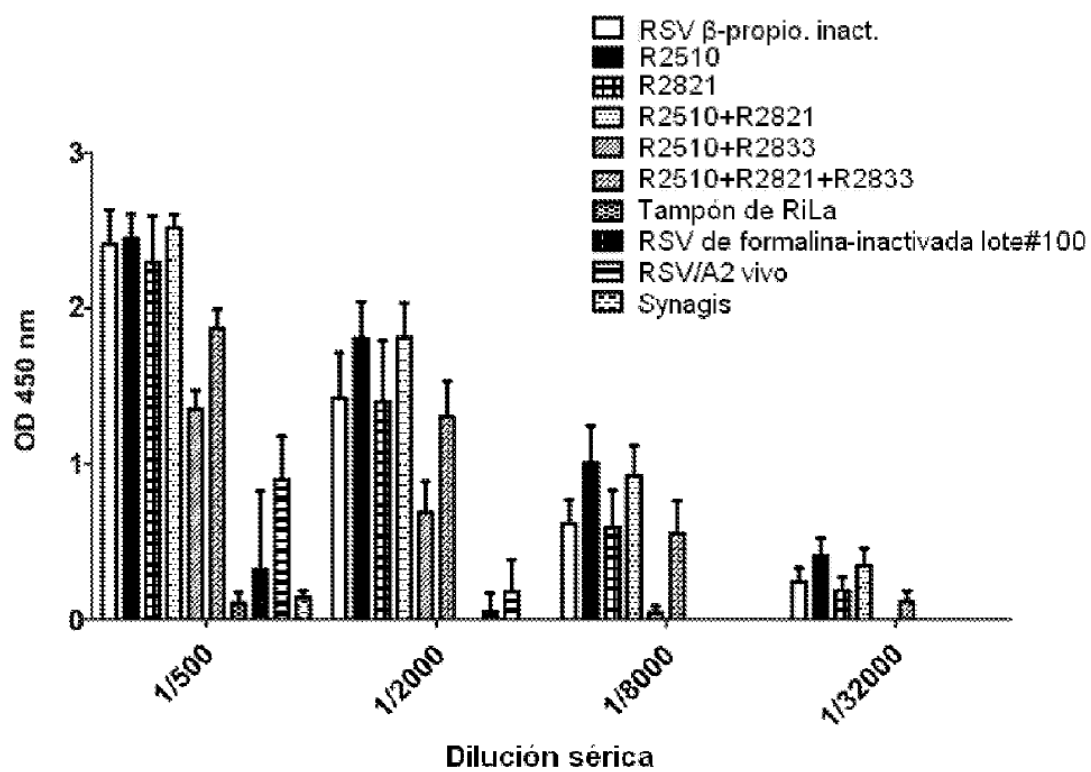


Fig. 11
(continuación)

**Fig. 12**

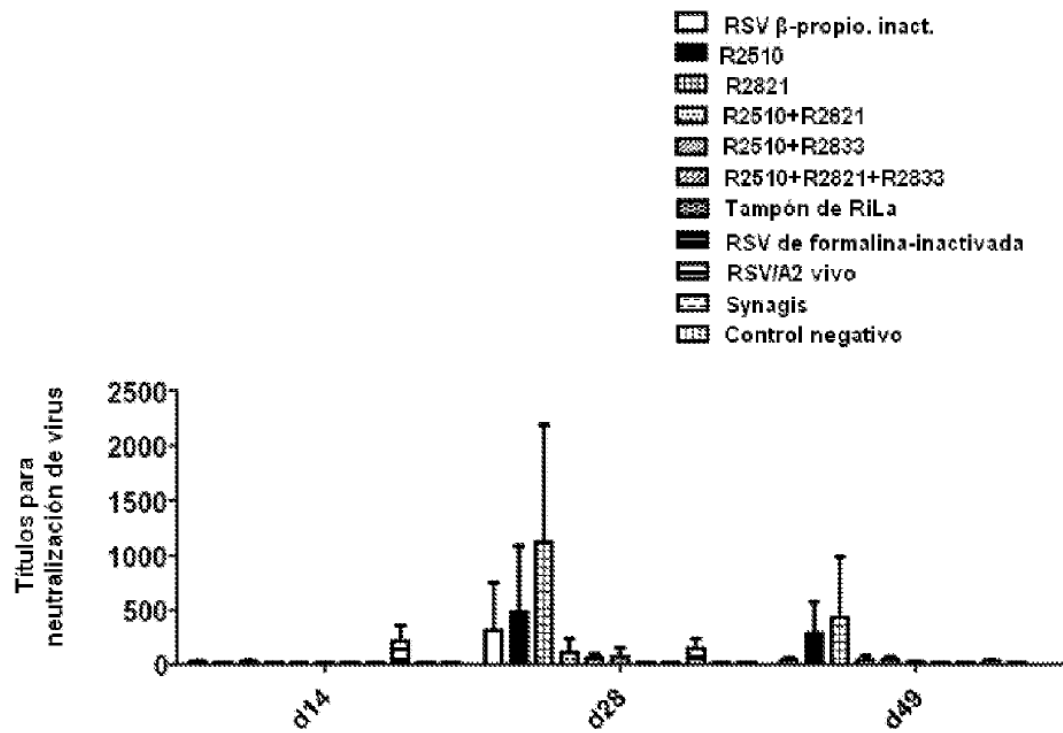


Fig. 13

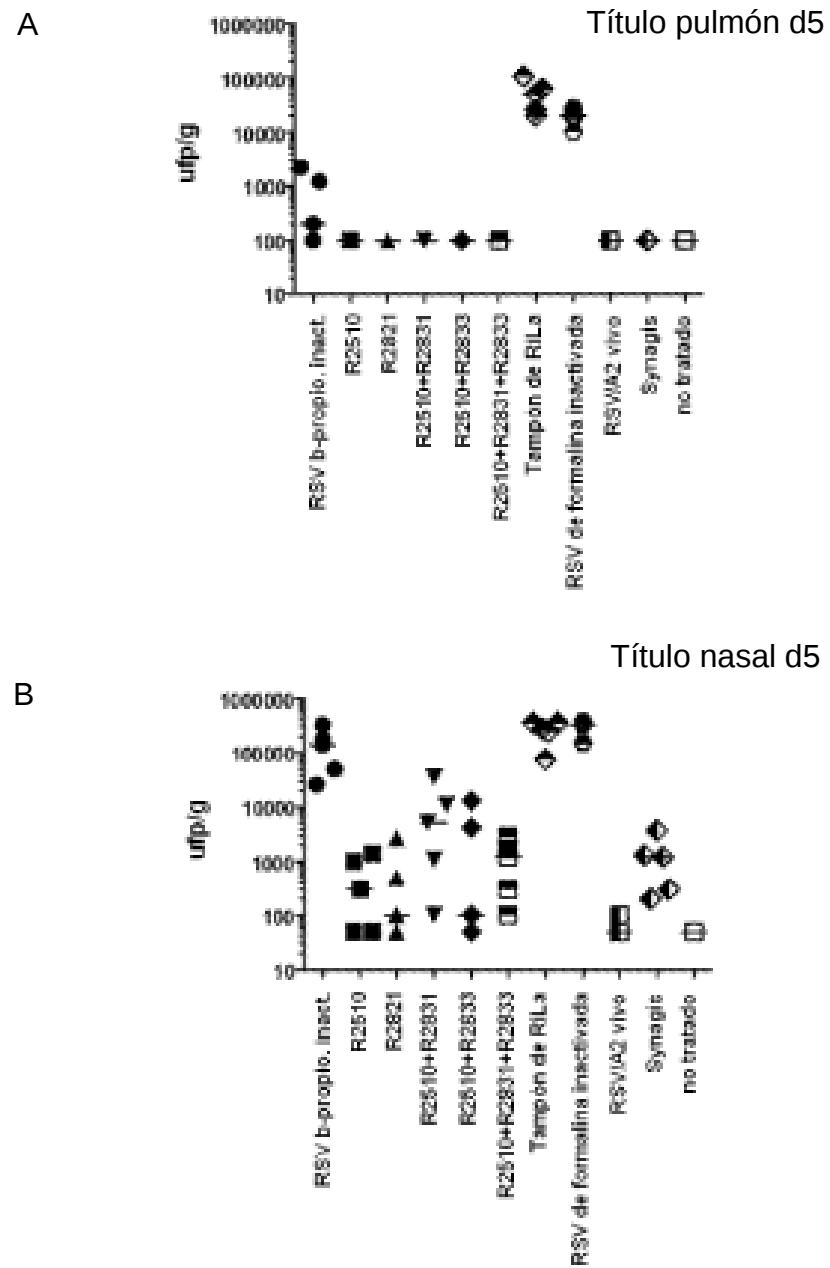


Fig. 14

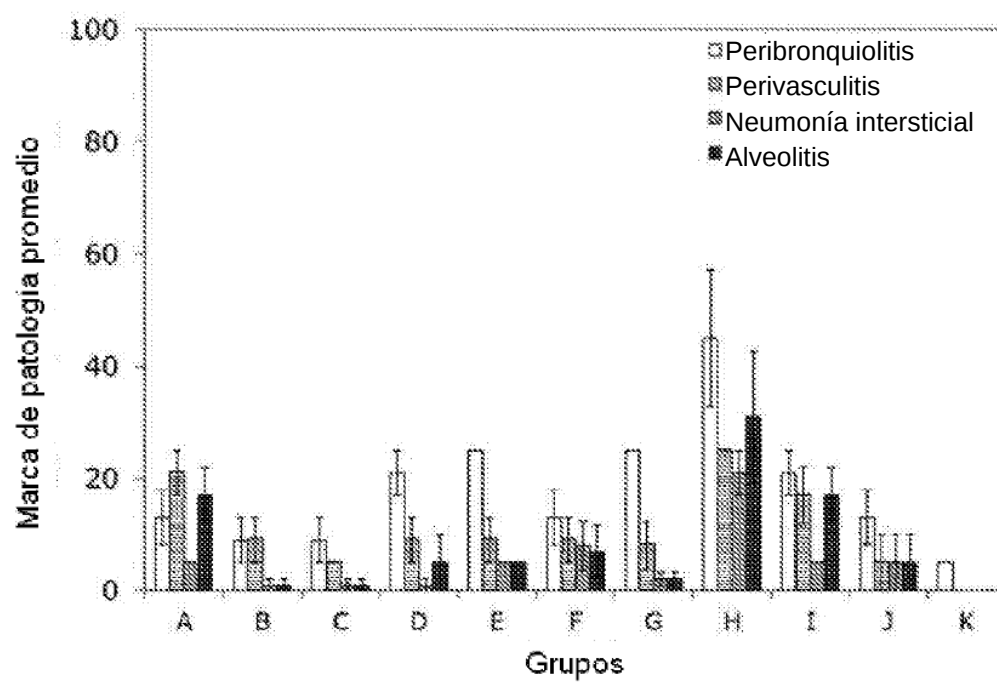
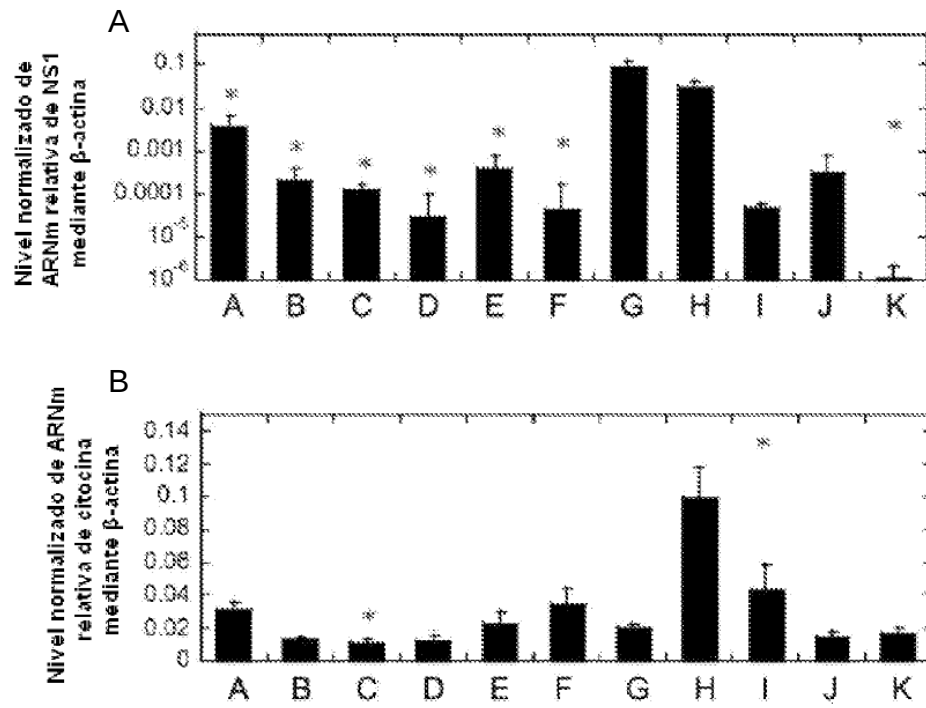


Fig. 15

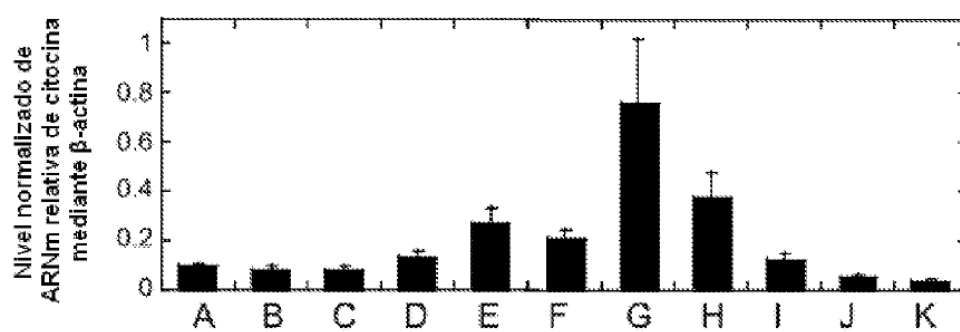
Análisis qRT-PCR de citoquina de pulmón y expresión de RSV NS1



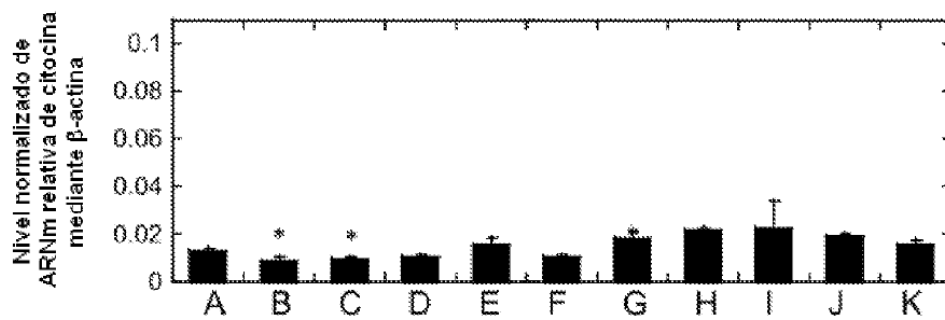
* $p < 0.05$ en comparación con el grupo G

Fig. 16

C



D



* $p < 0,05$ en comparación con grupo G

Fig. 16 (continuación)

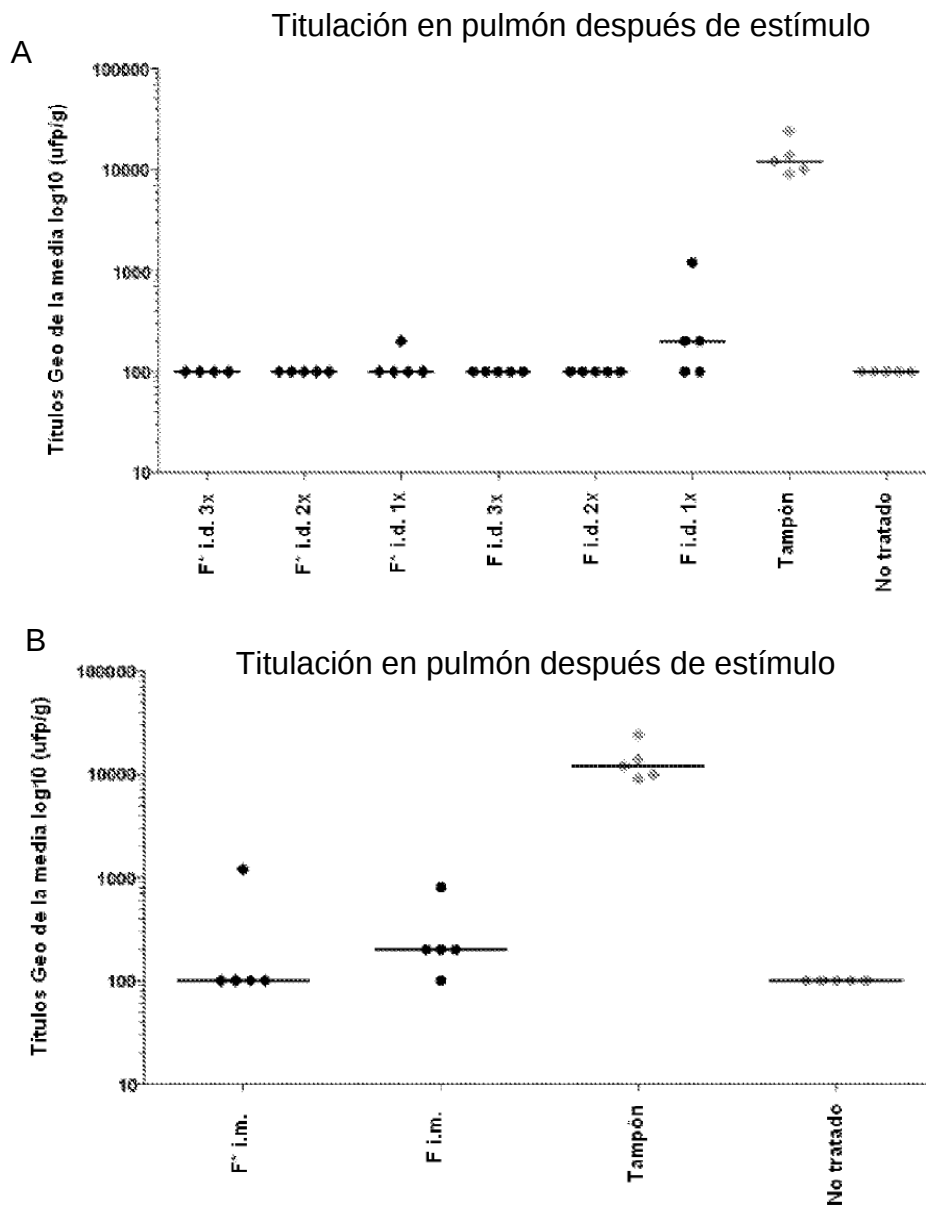


Fig. 17