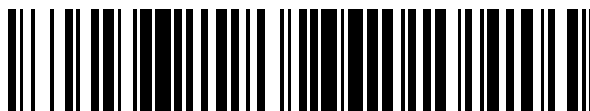


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 899**

51 Int. Cl.:

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2014 PCT/US2014/014054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14121021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2014 E 14746750 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2950886**

54 Título: **Epítomos de proteína F del virus sincitial respiratorio**

30 Prioridad:

01.02.2013 US 201361759664 P
14.03.2013 US 201361783380 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.08.2020

73 Titular/es:

MEDLMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

ULBRANDT, NANCY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 778 899 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

Epítomos de proteína F del virus sincitial respiratorio

5 Antecedentes

El virus sincitial respiratorio (RSV) es un virus del resfriado común que pertenece a la familia de los paramixovirus. El RSV es virulento, fácilmente transmisible y la causa más común de enfermedades del tracto respiratorio inferior en niños menores de 2 años. Hasta el 98 % de los niños que asisten a guarderías se infectarán en una sola temporada de RSV. Entre 0,5 % y 3,2 % de niños con infección por RSV requieren hospitalización. En Estados Unidos se informó de aproximadamente 90.000 ingresos hospitalarios y 4500 muertes al año. Los principales factores de riesgo de hospitalización por RSV son parto prematuro, enfermedad pulmonar crónica, cardiopatía congénita, inmunidad comprometida y edad inferior a 6 semanas en niños sanos. No se dispone de un tratamiento eficaz para la bronquiolitis positiva por RSV, además de la atención de apoyo en forma de nutrición adecuada y oxigenoterapia. No se ha demostrado que las terapias antivirales como Ribavirina sean eficaces para infección por RSV. Actualmente no hay vacuna disponible para profilaxis del RSV.

El único tratamiento específico para RSV disponible actualmente es un anticuerpo monoclonal humanizado, palivizumab (también denominado SYNAGIS®), que está aprobado por la US Food and Drug Administration para la prevención de la enfermedad respiratoria baja por RSV en bebés de alto riesgo. Sin embargo, el palivizumab no siempre es eficaz. Otro anticuerpo monoclonal, motavizumab, también denominado en este documento "mota", se derivaba de palivizumab con actividad antiviral mejorada. Tanto palivizumab como motavizumab se unen al sitio antigénico A, una región altamente conservada en la proteína RSV-F entre los aminoácidos 258 y 275. Se sabe que la mayoría de los anticuerpos anti-F, incluyendo palivizumab y motavizumab, reconocen un epítipo que es compartido por las dos conformaciones en donde RSV-F puede plegarse, la forma de pre-fusión metaestable y la conformación post-fusión altamente estable.

La presente divulgación proporciona un epítipo conformacional en la conformación pre-fusión de la proteína RSV-F, reconocida por un anticuerpo monoclonal D25 anti-RSV recientemente identificado, desvelado en WO 2008/147196. Al dirigirse a la estructura de RSV-F de pre-fusión, que es la diana activa para inhibición de fusión mediada por RSV-F, la presente divulgación también proporciona un método para detectar anticuerpos anti-RSV más eficaces que son menos susceptibles sucesos de unión no productivos, por tanto, puede proporcionar una mejor prevención o tratamiento para infecciones por RSV.

35 Breve sumario

En este documento se proporciona un epítipo conformacional en la superficie de una proteína de fusión del virus sincitial respiratorio (F del RSV), donde el epítipo comprende al menos 6 aminoácidos dentro de los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7 o aminoácidos 1 a 34 de la SEQ ID NO: 9, donde una proteína F del RSV que comprende el epítipo puede unirse específicamente por el anticuerpo monoclonal D25 o un fragmento, variante, análogo o derivado de unión a antígeno del mismo, siempre que la proteína F del RSV esté en conformación pre-fusión.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión aislada como se define en la reivindicación 1.

En una enseñanza, una proteína F del RSV en conformación pre-fusión que comprende el epítipo puede unirse por el anticuerpo monoclonal D25, o un fragmento, variante, análogo o derivado del mismo con al menos 100 veces mayor afinidad que una proteína F del RSV que comprende el secuencia de aminoácidos de las proteínas F derivadas de mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales (MARM), donde las proteínas F de los MARM comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14. El epítipo puede aparecer en la superficie de una proteína F del subtipo A del RSV humano, y también en la superficie de una proteína F del subtipo B del RSV humano.

En ciertas enseñanzas, la unión del mAb D25 al epítipo conformacional proporcionado en este documento se altera o destruye mediante diversos tratamientos conocidos por destruir la conformación previa a la fusión de la proteína F del RSV, *por ejemplo*, calentamiento, almacenamiento a largo plazo, fijación o desnaturalización.

El epítipo conformacional proporcionado en este documento está ubicado en el extremo C-terminal de las repeticiones de la héptada de proteína F.

Además se enseña una estructura aislada antígeno-anticuerpo que comprende el epítipo conformacional descrito anteriormente; específicamente unido a mAb D25 o un fragmento de unión a antígeno, variante, análogo o derivado del mismo. En ciertos aspectos, la estructura es una estructura cristalina.

Además se enseña una proteína de fusión aislada que comprende un fragmento de proteína F de RSV que consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 1 a 34 de la SEQ ID NO: 9; y un armazón polipeptídico, donde el armazón limita el fragmento de proteína F a una conformación que puede unirse específicamente

por el anticuerpo monoclonal D25 o un fragmento, variante, análogo o derivado de unión a antígeno del mismo. En ciertas enseñanzas, el armazón se deriva de una proteína de recubrimiento de superficie expuesta, *por ejemplo*, un inhibidor de proteasa como un inhibidor de proteasa de la familia de la calabaza. En ciertas enseñanzas específicas, el armazón se deriva del inhibidor II de tripsina de *Ecballium elaterium* (EETI-II). En ciertas enseñanzas, el bucle inhibidor de EETI-II se sustituye por los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 9. En ciertos aspectos, la proteína de fusión comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

Además se proporciona un polinucleótido aislado que codifica la proteína de fusión proporcionada en este documento, un vector de expresión que comprende el polinucleótido y/o una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o el vector.

En ciertos aspectos, la proteína de fusión proporcionada en el este documento puede ser parte de una composición inmunogénica que comprende la proteína de fusión y un vehículo, excipiente y/o adyuvante.

En un aspecto adicional, la proteína de fusión proporcionada en el presente documento puede usarse en un método para identificar anticuerpos anti-proteína F del RSV que se unen al epítipo conformacional proporcionado en Este documento, donde el método comprende seleccionar una biblioteca de anticuerpos para un anticuerpo que se une a la proteína de fusión como se reivindica, pero no se une solo al armazón.

Breve descripción de los dibujos/figuras.

FIGURA 1 muestra la unión del anticuerpo monoclonal D25 a células HEp-2 no fijadas y fijadas con acetona infectadas con el virus A2 del RSV (ATCC VR-1540), en comparación con la unión de palvizumab, motavizumab y R347 (como control negativo).

FIGURA 2 muestra la unión de motavizumab marcado con Eu^{3+} ("mota") y D25 a la proteína RSV-F *de novo* o tratada térmicamente. Las células 293 transfectadas de manera estable con proteína F de A2 del RSV se mantuvieron en hielo o se trataron en un baño de agua durante 15 minutos a 55 °C.

FIGURA 3 muestra el Análisis de Interferometría de Biocapa (Fig. 3A) para probar la unión de motavizumab ("mota") y D25 a la proteína RSV-F *de novo* o tratada térmicamente (Fig. 3B). Como control negativo se usó R347.

FIGURA 4 muestra la pérdida lenta de la unión de D25 a la proteína RSV-F después de almacenamiento a 4 °C, en comparación con la unión de motavizumab ("mota") a la proteína RSV-F en las mismas condiciones, según lo analizado por Interferometría de Biocapa.

FIGURA 5 muestra el Análisis de Interferometría de Biocapa para probar la unión de motavizumab y D25 a la proteína RSV-F *de novo* o tratada térmicamente, seguida de unión posterior a un anticuerpo policlonal de haz anti-hélice-6 de conejo (Fig. 5B) o un anticuerpo monoclonal anti-sitio C de RSV-F 1331H (inserción Fig. 5B). Motavizumab y D25 se inmovilizaron en un sensor de captura de Fc de IgG anti-humana (Fig. 5A).

FIGURA 6 muestra los sitios antigénicos conocidos en la proteína RSV-F. RSV-F tiene al menos seis sitios antigénicos neutralizantes descritos comúnmente, incluyendo los sitios A/II, B/I y C.

FIGURA 7 muestra el ensayo de unión competitiva usando varios anticuerpos anti-RSV-F con sitios antigénicos conocidos para identificar el epítipo D25. Para todos los ensayos de unión se usaron 100 ng/ml de anticuerpo D25 marcado con biotina. Figs. 7A-D muestran la competencia de los anticuerpos anti-RSV-F conocidos que se unen a A/II, B/I, C o un sitio desconocido, respectivamente.

FIGURA 8 muestra que el aminoácido 209 es importante para la actividad neutralizante del anticuerpo AM23.

FIGURA 9 muestra una alineación de secuencias de tipo silvestre de RSV-F y los mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales D25 (MARM) en el sitio antigénico D25 propuesto. Los aminoácidos en caja indican las mutaciones.

FIGURA 10 muestra el mapeo del epítipo D25 en la proteína RSV-F. La fig. 10A es un diagrama que muestra la ubicación de las 3 mutaciones de aminoácidos en los mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales D25 identificados (MARM). La fig. 10B es un modelo de relleno de espacio que muestra la ubicación del epítipo D25 identificado en la superficie de la proteína RSV-F. La flecha blanca en negrita indica la región del epítipo identificada crítica para la unión de D25.

FIGURA 11 muestra ensayos de neutralización que comparan las actividades de los anticuerpos monoclonales D25 y motavizumab ("mota") en los MARM de D25.

FIGURA 12 muestra ensayos de neutralización basados en células con células infectadas con MARM de D25 por palvizumab y anticuerpos monoclonales D25.

FIGURA 13 es un diagrama que ilustra la construcción del epítipo SK. La secuencia subrayada corresponde a los aminoácidos 195-211 de la proteína F de A2 del RSV, y la secuencia doble subrayada corresponde a los aminoácidos 212-228 de la proteína F de A2 del RSV, con una sustitución C212S.

FIGURA 14 muestra la comparación de la unión de D25 a la región HR1 o al epítipo SK de la proteína F de A2 del RSV, analizada por Interferometría de Biocapa.

Descripción detallada

Definiciones

A lo largo de esta divulgación, el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un polinucleótido" representa uno o más polinucleótidos. Como tal, en el presente documento los términos "un" (o "uno"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente.

Además, cuando en el presente documento se usa "y/o" se debe tomar como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término "y/o" como se usa en una expresión como "A y/o B" en este documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" como se usa en una expresión como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que siempre que en este documento se describan aspectos con la expresión "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia con la que se relaciona esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan una habilidad con un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

Unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en el este documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación, que se pueden obtener haciendo referencia a la memoria descriptiva como un conjunto. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Como se usa en este documento, el término "polipéptido" pretende abarcar un "polipéptido" singular así como "polipéptidos" plurales, y comprende cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos. Por tanto, como se usa en Este documento, un "péptido", un "fragmento peptídico", una "proteína", una "cadena de aminoácidos", una "secuencia de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen genéricamente en la definición de "polipéptido", aunque cada uno de estos términos puede tener un significado más específico. El término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o de manera intercambiable con cualquiera de estos términos. El término incluye además polipéptidos que han sufrido modificaciones postraduccionales o de síntesis posterior, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos que no se producen de forma natural.

Más específicamente, el término fragmento "peptídico" como se usa en este documento abarca un péptido de longitud inferior a la completa o una variante o derivado o análogo del mismo. Un "fragmento peptídico" como se desvela en este documento, *por ejemplo*, un fragmento peptídico RSV-F, puede ser parte de un polipéptido de fusión que comprende componentes adicionales de proteína F no RSV, como una proteína de recubrimiento expuesta a la superficie utilizada como armazón estructural. Como se describe en este documento un péptido también puede derivatizarse de varias maneras diferentes.

Los términos "análogo", "derivado" o "variante" cuando se refieren a un fragmento peptídico RSV-F incluyen cualquier fragmento peptídico que retiene al menos alguna actividad deseable, *por ejemplo*, la unión a un anticuerpo anti-RSV.

El término "variante", como se usa en este documento, se refiere a un péptido que difiere del péptido mencionado debido a sustituciones, deleciones, inserciones y/o modificaciones de aminoácidos. Se pueden producir variantes usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Las variantes también pueden, o alternativamente, contener otras modificaciones, *por ejemplo*, un péptido puede conjugarse o acoplarse, *por ejemplo*, fusionarse a una secuencia de aminoácidos heteróloga u otro resto, *por ejemplo*, para aumentar la vida media, la solubilidad o la estabilidad. Los ejemplos de restos para ser conjugados o acoplados a un péptido proporcionado en este documento incluyen, pero no se limitan a, albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, polietilenglicol (PEG) y similares. El péptido también se puede conjugar o producir acoplado a un conector u otra secuencia para facilitar síntesis, purificación o identificación del péptido (*por ejemplo*, 6-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

La expresión "identidad de secuencia" como se usa en este documento se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polinucleótidos o entre dos o más secuencias de polipéptidos. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por la misma base de ácido nucleico o aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia de comparación, se dice que las secuencias son "idénticas" en esa posición. El porcentaje de "identidad de secuencia" se calcula determinando el número de posiciones en donde se produce la base de ácido nucleico o aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones "idénticas". El número de posiciones "idénticas" se divide entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de "identidad de secuencia". El porcentaje de "identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación. Para alinear de manera óptima las secuencias para comparación, la parte de una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones denominadas huecos mientras la secuencia de referencia se mantiene constante. Una alineación óptima es aquella que, incluso con espacios, produce el mayor número posible de posiciones "idénticas" entre las secuencias de

referencia y de comparación. El porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias puede determinarse utilizando la versión del programa "Secuencias BLAST 2" que estaba disponible en el National Center for Biotechnology Information a partir del 1 de septiembre, 2004, programa que incorpora los programas BLASTN (para comparación de secuencias de nucleótidos)) y BLASTP (para comparación de secuencias de polipéptidos), cuyos programas se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993). Cuando se utilizan "Secuencias BLAST 2", los parámetros que eran parámetros predeterminados a partir del 1 de septiembre, 2004, se pueden usar para el tamaño de palabra (3), penalización por hueco abierto (11), penalización por hueco de extensión (1), disminución de hueco (50), valor esperado (10) y cualquier otro parámetro requerido, incluyendo, entre otras, la opción de matriz.

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de cadena sencilla Fv (scFv), anticuerpos multiespecíficos como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una parte de unión a antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos exhiben la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas.

Por "se une específicamente", generalmente se entiende que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión implica algo de complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado.

La expresión "anticuerpo anti-RSV" o "anticuerpo RSV" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un virus RSV.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto. Específicamente, un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo intacto es una parte del anticuerpo que puede unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "epítipo" se refiere a esa parte de un antígeno capaz de ser reconocido y específicamente unido por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente tras la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente tras la desnaturalización de proteínas. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. En una realización específica, un epítipo incluye al menos 6 aminoácidos.

Un "epítipo lineal" o un "epítipo secuencial" es un epítipo que es reconocido por los anticuerpos por su secuencia lineal de aminoácidos, o estructura primaria. Un "epítipo conformacional" o un "epítipo no secuencial" es un epítipo que es reconocido por los anticuerpos por su estructura terciaria. Los restos que constituyen estos epítopos pueden no ser contiguos en la secuencia de aminoácidos primaria, pero se unen en la estructura terciaria de la molécula. Los epítopos lineales y conformacionales generalmente se comportan de manera diferente cuando una proteína se desnaturaliza, fragmenta o reduce. En ciertas realizaciones, se puede encontrar un epítipo de conformación en una forma de una proteína, *por ejemplo*, la conformación previa a la fusión de una proteína F del RSV, pero no en otra conformación, *por ejemplo*, una conformación posterior a la fusión de una proteína F del RSV. La fragmentación de una proteína o la reducción de sus enlaces disulfuro a menudo destruyen los epítopos conformacionales.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) y su compañero de unión (*por ejemplo*, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en este documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (*por ejemplo*, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación (K_D). La afinidad se puede medir por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. En la técnica se conocen una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente divulgación. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

La expresión "composición inmunogénica", como se usa en este documento, se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno de RSV, composición que puede usarse para prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada a infección por RSV en un sujeto. Una composición inmunogénica preferente puede inducir, estimular o mejorar la respuesta inmune contra el RSV.

Los términos "composición" o "composición farmacéutica" se refieren a composiciones que contienen un polipéptido aislado proporcionado en este documento, junto con, *por ejemplo*, vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para administración a un sujeto que necesita tratamiento, *por ejemplo*, un sujeto humano infectado con el virus RSV.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva u otras complicaciones proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable.

El término "sujeto" significa cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, que necesita tratamiento con una composición que comprende un polipéptido aislado proporcionado en este documento. Los sujetos mamíferos incluyen, entre otros, humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, osos, vacas, simios, monos, orangutanes y chimpancés, etc. En una realización, el sujeto es un sujeto humano.

Proteína F del RSV

El virus sincitial respiratorio (RSV) pertenece al género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*. El genoma viral consiste en una molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa que codifica 11 proteínas. Dos de estas proteínas son las principales glicoproteínas de la superficie del virión, en particular: (i) la proteína de unión (G) que media la unión del virus a la superficie celular y (ii) la proteína de fusión (F) que promueve la fusión del virus y las membranas celulares durante la entrada del virus y también la fusión de las membranas de las células infectadas con células circundantes para formar sincitios. Dos grupos antigénicos principales, A y B, se distinguen principalmente por diferencias en la proteína G, siendo el grupo A el más prevalente.

La proteína RSV-F es una glicoproteína tipo I que se ensambla como un homotrímero. Cada monómero se sintetiza como un precursor inactivo (F0) que necesita ser escindido en dos sitios polibásicos (I y II) para volverse competente en fusión. La proteína F asume una conformación de pre-fusión metaestable en la partícula del virus hasta que el virus se une a la membrana diana. La proteína F se activa luego para iniciar una serie de cambios conformacionales para que la fusión ocurra en el momento correcto y en el lugar correcto. Después de la fusión, la proteína F adquiere una conformación post-fusión altamente estable determinada principalmente por la formación de un paquete de seis hélices (6HB), compuesto por secuencias de dos repeticiones de héptada (HR1 y HR2) de cada monómero. La energía libre liberada durante la transición de la proteína F desde la estructura previa a la fusión a la posterior a la fusión impulsa el proceso de fusión de la membrana.

La expresión "proteína RSV-F" se refiere a una proteína F de longitud completa que se produce de forma natural o recombinante a partir de un virus RSV, y fragmentos, variantes, análogos o derivados de los mismos. Una proteína F del RSV puede estar en conformación previa o posterior a la fusión. En ciertas realizaciones, el virus RSV es un virus RSV humano. En ciertas realizaciones, el virus RSV es del subtipo A. En una realización específica, el subtipo A del RSV es A2 del RSV. En otras realizaciones, el virus RSV es del subtipo B. En una realización específica, el subtipo B del RSV es RSV 18537. En otra realización específica, el RSV subtipo B es RSV B9320.

Los términos "proteína F *de novo*" o "proteína F pre-fusión" se refieren a una proteína RSV-F en su conformación pre-fusión. Se ha demostrado que la proteína RSV-F nativa no activada existe en un estado metaestable que se puede convertir *in vitro* en la conformación de haz de seis hélices fusogénica más estable por un aumento en la energía térmica, como calentando de 55 °C a 60 °C durante 10 a 15 minutos.

A continuación se muestran secuencias de proteína F representativas de RSV-A (cepa A2) y RSV-B (cepa 18537). Los péptidos señal predichos están doblemente subrayados, y las regiones identificadas para contener el epítipo para mAb D25 están subrayadas individualmente.

Secuencia de la proteína F de RSV-A de la cepa A2 (SEQ ID NO: 1)

> gi|2627305|gb|AAB86664.1| precursor de glicoproteína F de fusión [virus sincitial respiratorio humano]

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLS KKRKRRLFLG LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIATV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STINIMITTI IIVIIVILLS
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN

Secuencia de la proteína F de RSV-B de la cepa 18537 (SEQ ID NO: 2)

> gi|222565|dbj|BAA00240.1| precursor de la proteína de fusión [virus sincitial respiratorio humano]

1 MELLIHRSSA IFLTLAVNAL YLTSSQONITE EFYQSTCSAV SRGYFSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKETKCN GTDTKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQNT PAANNRARRE APQYMNITIN
 121 TTKNLNVSIS KKRKRRLFLG LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKNA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYIN NRLLPVNVQQ SCRISNIETV IEFQQMNSRL LEITREFSVN
 241 AGVTPLSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPIYGVID TPCWKLHTSP LCTTNIKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQADTCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVS LCNTDIFNSK YDCKIMTSKT DISSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KLEGKNLYVK GEPIINYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRSD ELLHNVNTGK STTNIMITTI IIVIIVVLLS
 541 LIAIGLLLYC KAKNTPVTLS KDQLSGINNI AFSK

Anticuerpo D25 anti-RSV

10 Las expresiones "anticuerpo monoclonal D25" o "mAb D25" se refieren al anticuerpo monoclonal anti-RSV designado "D25", así como a un fragmento, variante, derivado y/o análogo de unión a antígeno del mismo, como se describió previamente en WO 2008/147196.

15 También se incluyen fragmentos, derivados, análogos o variantes de un mAb D25, y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" cuando se refieren a D25 mAb se refieren a cualquier polipéptido que retiene al menos algunas de las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo o polipéptido de anticuerpo correspondiente de la invención. Los fragmentos incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpos específicos discutidos en otra parte de este documento. Las variantes de los mAb D25 incluyen fragmentos como se describió anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ocurrir naturalmente o no de forma natural. Los anticuerpos variantes pueden comprender sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Como se usa en este documento, un "derivado" de un mAb D25 se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene uno o más restos derivados químicamente por reacción de un grupo lateral funcional. Un análogo de un mAb D25 tiene propiedades análogas. Esto se hace, por ejemplo, mediante exploración de una biblioteca peptídica o biblioteca de presentación de fagos para análogos de D25 que se unen al epítipo conformacional proporcionado en este documento.

Epítipos proteicos de RSV-F

30 Como se demostró en los Ejemplos, mAb D25 se une a un epítipo conformacional en la forma de pre-fusión de la proteína F del RSV. D25 no se une abundantemente a la proteína F soluble. D25 se une a la superficie de las células infectadas con RSV no fijadas, pero no se une a las células infectadas fijadas. Además, D25 no se une a la superficie de las células infectadas que se han calentado, un tratamiento *in vitro* que induce a la proteína F del RSV a asumir la conformación post-fusión.

35 Esta divulgación enseña un epítipo conformacional en la superficie de una proteína de fusión del virus sincitial respiratorio (F del RSV), que comprende al menos 6 aminoácidos dentro de los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7 (es decir, los aminoácidos 195 a 228 de SEQ ID NO: 1) o los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 9 (es decir, los aminoácidos 195 a 228 de SEQ ID NO: 2). Como se proporciona en este documento, una proteína F del RSV que comprende el epítipo puede unirse específicamente por el anticuerpo monoclonal D25 o un fragmento, análogo, variante o derivado de unión a antígeno del mismo, siempre que la proteína F del RSV esté en conformación pre-fusión.

En ciertas realizaciones, una proteína F del RSV en conformación de pre-fusión que comprende un epítipo conformacional como se proporciona en este documento puede unirse por el anticuerpo monoclonal D25, o un fragmento, variante, análogo o derivado del mismo con al menos una afinidad 100 veces mayor que una proteína F del RSV que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 (mutantes MARM).

5 Un epítipo conformacional como se proporciona en este documento puede ubicarse en la superficie de una proteína F del subtipo AV del RSV humano, *por ejemplo*, de la cepa A2 del RSV o una proteína F del subtipo BV del RSV humano, *por ejemplo*, de la cepa 18537 del RSV.

10 También se enseña una estructura aislada que comprende un epítipo de conformación como se proporciona en este documento y como se describió anteriormente, donde el epítipo se une específicamente al anticuerpo monoclonal D25 o un fragmento, variante, análogo o derivado de unión a antígeno del mismo. En ciertas realizaciones, la estructura es una estructura cristalina.

15 También se enseña una proteína de fusión aislada que comprende un epítipo conformacional como se proporciona en este documento. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión incluye un fragmento de proteína F del RSV que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 9; y un armazón polipeptídico. Según la invención, la proteína de fusión está limitada en una conformación que puede unirse específicamente por el anticuerpo monoclonal D25 o un fragmento, variante, análogo o derivado de unión a antígeno del mismo. En ciertas enseñanzas, el armazón puede comprender una proteína de recubrimiento de superficie expuesta. En algunas enseñanzas, la proteína de recubrimiento de superficie expuesta es un inhibidor de proteasa, como uno de la familia Kunitz o la familia de inhibidores de proteasa de calabaza. Según las enseñanzas, la proteína del armazón es el inhibidor II de tripsina de *Ecballium elaterium* (EETI-II). Christmann *et al.* Protein Eng. 12:797-806 (1999). En ciertas enseñanzas, el bucle inhibidor de EETI-II se sustituye por los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 9. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

20 Cualquiera de los polipéptidos enseñados En este documento puede ser parte de un péptido de fusión, en donde el epítipo RSV-F está limitado conformacionalmente en un armazón estructural. El péptido de fusión puede o no comprender secuencias conectoras. En algunas enseñanzas, el epítipo se fusiona con una proteína de recubrimiento de superficie expuesta.

25 En una realización, el bucle inhibidor de EETI-II (correspondiente a los restos 3-8) se incluye por los restos 195-228 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una enseñanza más específica, se sustituye la cisteína en la posición 212 de la proteína RSV-F.

30 También se proporciona un polinucleótido aislado que codifica cualquier proteína de fusión como se describe en este documento. Además se proporciona un vector, *por ejemplo*, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y una célula hospedadora que comprende el polinucleótido o el vector.

35 También se enseña un antígeno de RSV recombinante que comprende un péptido de fusión como se describe en este documento. En ciertas realizaciones, una proteína de fusión como se proporciona en este documento puede formularse como una composición inmunogénica que, cuando se administra a un sujeto que la necesita, puede provocar una respuesta inmune contra el RSV. En ciertas enseñanzas, una composición inmunogénica comprende uno o más de un vehículo, un excipiente o un adyuvante.

40 Las composiciones de la divulgación pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos. Los métodos de preparación adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). La composición puede estar en una variedad de formas, que incluyen, entre otras, una solución acuosa, una emulsión, un gel, una suspensión, una forma liofilizada o cualquier otra forma conocida en la técnica. Además, la composición puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, estabilizadores y conservantes. Una vez formuladas, las composiciones que se proporcionan en este documento pueden administrarse directamente al sujeto.

45 Los vehículos que pueden usarse con las composiciones proporcionadas en este documento son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, *por ejemplo*, tiroglobulina, albúminas como albúmina de suero humano, toxoide tetánico y poliaminoácidos como poli L-lisina, poli ácido L-glutámico, gripe, proteína central del virus de la hepatitis B y similares. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, *por ejemplo*, agua, agua tamponada, solución salina al 0,8 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares. Las composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas, o pueden filtrarse estérilmente. Una composición resultante puede envasarse para su uso como tal, o liofilizarse, siendo la preparación liofilizada combinada con una solución estéril antes de administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, *etc.*

En ciertas enseñanzas, una proteína de fusión como se proporciona en este documento puede usarse en un método para identificar anticuerpos anti-proteína F de RSV que se unen al mismo epítipo conformacional que se describe en este documento, y por tanto son análogos al mAb D25. Por ejemplo, la proteína de fusión puede usarse para seleccionar una biblioteca de anticuerpos para anticuerpos que se unen a la proteína de fusión, pero no se unen a la proteína del armazón sola. Las bibliotecas de anticuerpos y los métodos de selección y/o detección de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno particular son bien conocidos por los expertos en la materia.

Algunas secuencias de epítopos de RSV-F utilizadas en las enseñanzas se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

10 **Tabla 1. Secuencias de repetición de Héptada para construcciones de proteína RSV-F**

<p>1A. HR1xHR2 (SEQ ID NO: 3) - que contiene los aminoácidos 153-221 (negrita) y los aminoácidos 476-520 (cursiva) de la proteína F de A2 del RSV.</p> <p>– MghhhhhhhhhssghidddkxMAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSL NGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSGGSGKGGTGGGSGKNFYDPL <i>VFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGK</i></p>
<p>1B. HR1 (SEQ ID NO: 4) - que contiene los aminoácidos 153-221 (negrita) de la proteína F de A2 del RSV.</p> <p>– MghhhhhhhhhssghidddkxMAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSL NGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQS</p>
<p>1C. Epítipo SK: contiene los aminoácidos 195-211 (en negrita y subrayados) de la región HR1 de la proteína F de A2 del RSV y los aminoácidos posteriores 212-228 (doblemente subrayados, con mutación C212S) de la proteína F Adel RSV, que reemplaza el bucle inhibidor de EETI-II (Fig. 8).</p> <p>– QPAMAMDIGINSDPGCEFLKNYIDKQLLPVINKQSSISNIATVIEFQQKN <u>NLQCKQDSDCLAGCVCGPNGFCGVDKLAA (SEQ ID NO:5)</u></p>
<p>- ALEHHHHHH (conector y su etiqueta que se fusionarán con SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 6)</p>

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; el tratado, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se establecen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2^a ed.; Oxford Univ. Press). Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se establecen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se establecen en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2^a ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Además, métodos convencionales de inmunología conocidos en la técnica in escritos específicamente se siguen generalmente como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8^a ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY).

Las obras de referencia convencionales que presentan principios generales de inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Amsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) Kuby Immunology (4ª ed.; H. Freeman & Co.); Roitt *et al.* (2001) Immunology (6ª ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005) Cellular and Molecular Immunology (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

D25 se une a células que expresan la forma de pre-fusión de la proteína RSV-F

En un esfuerzo por comprender los requisitos para unirse al epítipo de neutralización reconocido por el anticuerpo D25, se emplearon varias estrategias.

Primero, se realizó un ensayo ELISA para probar la unión de D25 a células HEp-2 fijadas o no fijadas con acetona infectadas con un virus RSV-A2 (ATCC VR-1540), para determinar si D25 se une a la conformación pre-fusión o post-fusión de la proteína RSV-F. También se probó la unión de otros dos anticuerpos monoclonales de proteína anti-RSV-F, palivizumab y motavizumab. Como control negativo para la unión se usó R347.

HEp2 (ATCC CCL-23) se cultivaron hasta un 90 % de confluencia en medio EMEM más FBS al 5 % en una placa de 96 pocillos. Las células se infectaron con una multiplicidad de infección de 0,5-1,0 (suponiendo un número total de células por pocillo de $\sim 5 \times 10^4$) del virus RSV A2 (ATCC VR-1540). Después de infección durante 24 horas, se retiró el medio y las células se fijaron a la placa mediante secado (sin fijar) o mediante tratamiento durante 20 minutos con acetona al 80 % y luego se secaron. Las capas de células infectadas se bloquearon con bloqueo de caseína al 1 % (Thermo) durante 1 hora antes de incubación con anticuerpo diluido en caseína en un intervalo de 1000 ng/ml a 1 ng/ml. El anticuerpo se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS/Tween-20 al 0,1 % y se incubó con una dilución 1:10000 de anticuerpo conjugado con HRP anti-humano (Jackson Immuno-research) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y desarrollaron usando el reactivo SureBlue Reserve (KPL). La absorbancia se midió a 450 nm.

Como se muestra en Fig. 1A, D25 se unió a células HEp-2 infectadas con RSV-A2 no fijadas de una manera dependiente de la concentración, pero mostró poca unión a las células HEp-2 infectadas con RSV-A2 fijadas con acetona (Fig. 1B), mientras que palivizumab y motavizumab se unió a células tanto fijadas como no fijadas de manera similar.

Ejemplo 2

D25 no se une a la proteína RSV-F tratada térmicamente

Para confirmar que D25 solo reconoce un epítipo conformacional en la proteína RSV-F de pre-fusión, la unión de D25 marcado con Eu^{3+} se probó en la proteína RSV-F *de novo* no calentada que representa la forma de pre-fusión, o proteína RSV-F calentada (volteado) que se asemeja a la forma post-fusión.

Una secuencia 293 transfectada establemente que expresa la secuencia de la proteína F de A2 del RSV bajo el promotor inducible por tetraciclina (células TREx-F) se ha descrito previamente en Huang, K. *et al.*, Virus Genes 40:212-221 (2010). Motavizumab, D25 y R347 (como control negativo) se marcaron con Eu^{3+} usando el quelato de marcado Delfia Eu-N1-ITC y se caracterizaron según las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer). Las células TREx-F se cultivaron hasta confluencia y se indujo la expresión de proteína F con tetraciclina a 15 $\mu\text{g/ml}$ durante 20 h después de inducción. Luego, las células se recogieron y se resuspendieron a $\sim 1 \times 10^7$ células viables/ml en medios al 50 %/tampón de unión LR al 50 % (sistema de tampón basado en Tris, Perkin Elmer). Las células se mantuvieron en hielo o se trataron en un baño de agua de 15 minutos a 55 °C. Aproximadamente 1×10^5 células se mezclaron con motavizumab marcado con Eu^{3+} 25 nM, D25 o R347 en tampón de unión LR en un volumen de reacción de 100 μl . Las células más el anticuerpo monoclonal se incubaron durante 1 hora a 4 °C y luego se añadieron a placas de filtro de vacío Pall GHP. El anticuerpo monoclonal no unido se lavó con 5 x 200 μl de lavados con tampón de lavado de ensayo Delfia (Perkin Elmer), y se liberó la fluorescencia del Eu^{3+} con la adición de 200 μl de Solución de Mejora (Perkin Elmer). La fluorescencia resuelta en el tiempo se leyó en un lector Envision (Perkin Elmer) después de 1 h de incubación a 37 °C con agitación suave. Los recuentos de Eu^{3+} se convirtieron en ng de IgG unida, y motavizumab o D25 unido específico se calculó restando la unión no específica R347 del límite total.

Como se muestra en Fig. 2, el calentamiento de las células 293 que expresan RSV-F a 55 °C durante 15 min ángulo casi por completo la unión de D25 a las células (Fig. 2B), mientras que solo disminuyó ligeramente la unión de motavizumab (Fig. 2A). Por tanto, este resultado del ensayo de unión celular confirma que D25 reacciona a un epítipo conformacional que solo existe en la forma de pre-fusión de la proteína RSV-F.

5

Ejemplo 3

Estudios de unión a D25 mediante Análisis de Interometría de Biocapa

10 El análisis de interometría de biocapa se usó para determinar el efecto del cambio conformacional de la proteína RSV-F mediante calentamiento o almacenamiento a largo plazo a 4 °C en la unión de D25 a la proteína RSV-F.

15 Como se ilustra en Fig. 3A, para probar el efecto del calentamiento, el anticuerpo monoclonal 1331H, que reacciona al sitio C definido de la proteína RSV F (Yunus *et al.*, Virology, 396(2): 226-237 (2010); Beeler y Coelingh, Journal of Virology, 63(7): 2941-2950 (1989)), se unió a un sensor de captura de Fc anti-ratón (ForteBio). Los sensores se incubaron primero con la proteína RSV-F que se calentó a 60 °C durante 10 minutos o sin calentar (*de novo*), luego se trasladó a los pocillos que contenían motavizumab, R347 (control negativo). La unión del anticuerpo al complejo sensor + 1331H + sF se detectó como desviación de la señal leída como un cambio en los nm de luz (Δ nm).

20 Como se muestra en Fig. 3B, según los resultados de unión celular en el Ejemplo 2, la unión de D25 a la proteína RSV-F se anuló casi por completo cuando la proteína F se calentó, mientras que motavizumab se unió a las proteínas RSV-F *de novo* y calentadas.

25 De manera similar, para probar el efecto del almacenamiento a largo plazo a 4 °C, el complejo sensor + 1331H se incubó primero con proteína RSV-F que se almacenó a 4 °C en medio CD CHO durante 6 a 7 semanas o sin almacenamiento, luego se trasladó a los pocillos que contenían D25 o Motavizumab, y se midió Δ nm.

30 Fig. 4 muestra que hubo una pérdida lenta de unión de D25 a la proteína RSV-F cuando se almacenó a 4 °C en medio CD CHO, probablemente debido al cambio conformacional de la proteína F. Por el contrario, motavizumab no mostró pérdida de unión después de almacenamiento durante 7 semanas a 4 °C, según el hallazgo de que reconoce un epítipo no conformacional.

35 Tomados en conjunto, estos experimentos de Análisis de Interometría de Biocapa confirman aún más que D25 reacciona a un epítipo conformacional que existe en la forma de pre-fusión de la proteína RSV-F.

Ejemplo 4

D25 no compete con el anticuerpo de haz anti-hélice-6

40 El análisis de interometría de biocapa se utilizó para determinar aún más la ubicación del epítipo D25, en particular, para probar si D25 compete con otros anticuerpos contra el RSV con regiones de epítipo bien caracterizadas.

45 Como se ilustra en Fig. 5A, D25, motavizumab o el anticuerpo de control negativo R347 se unieron a un sensor de captura de Fc de IgG anti-humana (ForteBio) a una concentración de 1,5 μ g/ml. Los sensores se trasladaron a un pocillo que contenía tampón cinético (ForteBio) para establecer un valor inicial antes de pasar a un pocillo que contenía medio CHO que contenía sF que se calentó a 60 °C durante 10 minutos o sin tratar. Los sensores se trasladaron al siguiente pocillo que contenía 30 μ g/ml de IgG policlonal de conejo purificada por afinidad, reactiva al haz de seis hélices de la forma post-fusión de la proteína F del RSV o a 15 μ g/ml de mAb 1331H, un anticuerpo que reacciona con el sitio C definido de la proteína F del RSV (Yunus *et al.*, Virology, 396 (2): 226-237 (2010); Beeler y Coelingh, Journal of Virology, 63(7): 2941-2950 (1989)). Todas las curvas de unión se restaron al inicio respecto al anticuerpo de control negativo. La unión de proteína al sensor se detecta como una desviación de la señal leída como un cambio en el nm de luz (Δ nm).

50 Los resultados mostrados en Fig. 5B confirman que D25 se unió a la proteína RSV-F no calentada (pre-fusión), pero no a la proteína F tratada térmicamente (post-fusión) que tenía una fuerte unión al haz de anticuerpo anti-hélice-6 (6xHB) de conejo. La inserción en la Fig. 5B muestra que D25 y 1331H reconocen diferentes epítipos en la forma pre-fusión de la proteína RSV-F.

Ejemplo 5

D25 no compete con anticuerpos que se unen a sitios antigénicos A, B o C

60 La proteína RSV-F tiene al menos 6 sitios antigénicos neutralizantes descritos comúnmente. Los anticuerpos monoclonales anti-RSV previamente identificados, palvizumab (SYNAGIS®), motavizumab, 1153, 1121, 13/19, 92-11C, 131-2A, 1331H y 1308F, se unen a sitios antigénicos A/II, B/I bien caracterizados, o C, como se ilustra en Fig. 6.

65

Para determinar si D25 se une a cualquiera de estas regiones antigénicas bien caracterizadas, se realizaron ensayos de unión competitivos para probar si alguno de los anticuerpos anti-RSV mencionados anteriormente puede competir con D25 por su sitio antigénico. En todos los ensayos de unión se usaron 100 ng/ml de anticuerpo D25 marcado con biotina. Como control positivo se usó D25 y R347 como control negativo. La absorbancia se midió a 450 nm.

Como se muestra en Figs. 7A-C, ninguno de los anticuerpos conocidos porque se unen al sitio antigénico A, B o C pudieron competir con D25 por su unión a la proteína RSV-F, lo que indica que D25 no se une al sitio A, B o C. Por otro lado, como se muestra en Fig. 7D, algunos anticuerpos anti-RSV-F con sitio antigénico desconocido, en particular, AM22 y AM23, compitieron eficazmente con D25 en el ensayo de unión, sugiriendo que el epítipo de D25 se superpone con los de AM22 y AM23. AM23 compitió con D25 más eficazmente que AM22, sugiriendo que su epítipo puede ser más similar al de D25.

AM22 y AM23 se desvelaron previamente en US 2012/0070446 A1 y US 2010/0239593 A1, respectivamente. Anteriormente se descubrió que AM23 no neutralizaba ninguna de las cepas B de RSV excepto para un aislado clínico (CP096-B15). También se demostró que el aminoácido 209 era importante para la actividad de neutralización de AM23 (Fig. 8). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que D25 puede unirse a una región antigénica que incluye el aminoácido 209.

Ejemplo 6

Mapeo del epítipo D25

Este ejemplo informa la generación de una serie de mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales (MARM) que no pueden ser neutralizados por D25, para determinar aún más qué aminoácidos de la proteína RSF-F son críticos para la unión de D25.

Este análisis se realizó en un aislado A y un aislado B del virus RSV. Brevemente, se incubaron $1-5 \times 10^6$ pfu/ml de los virus 18537 de RSV A2 o RSV B en 450 ng/ml ($200 \times C_{I50}$) D25 mAb durante 1 hora antes de infección de células HEp2 confluentes en una placa de 24 pocillos. Hasta 6 días después de infección, las placas se congelaron y descongelaron para liberar el virus y los sobrenadantes de este proceso se pasaron sobre una nueva capa confluyente de células Hep2 después de una incubación de 2 horas con 450 ng/ml de D25. Se realizó un tercer pasaje como se describe para el segundo pasaje. El rendimiento del virus después de 3 rondas de selección fue de 8×10^5 a 3×10^6 para el virus A2 y de $1,3 \times 10^4$ a 5×10^4 para el virus B. Después del tercer pasaje, las células fueron retenidas, lisadas y el ARN total se aisló de las células. El gen de la proteína F se amplificó por PCR y se secuenció.

Se aislaron ocho MARMS de D25 (los MARM A1-A5 y B1-B3 del RSV). Se encontró que los MARM A1-A5 tenían las mismas mutaciones (Fig. 9). Se encontró que los MARM B2 y B3 tenían las mismas mutaciones (Fig. 9).

Las proteínas F mutantes para los MARM A1, B1 y B2 del RSV se muestran a continuación y en la Fig. 10A. El péptido señal está doblemente subrayado, la región que comprende el epítipo conformacional en la proteína F de A2 del RSV de tipo silvestre está subrayada. El aminoácido mutante para cada mutante se muestra en **NEGRITA**.

Secuencia de la Proteína F de MARM A1 (SEQ ID NO: 12)

1 MELLILKANA ITLILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRRLGFG LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNQVSVLTS KVLDLKNYID KQLLP**IVYKQ** SCSISNIATV IEFQQKNRRL LEITREFSVN
 241 AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRIDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFSPDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STINIMITTI IIVIIVILLS
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN

Secuencia de la Proteína F de MARM B1 (SEQ ID NO: 13)

1 MELLIHRSSA IFLTLAVNAL YLTSSQNITE EFYQSTCSAV SRGYFSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKETKCN GTDTKVLIK QELDKYKNAV TELQLMQNT PAANNRARRR APQYMYNTIN
 121 TTKNLNVSIS KKRKRRLFLG LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKNA LLSTNKAVVS
 181 LSNRVSVLTS KVLDLKNYIN DRLLPIVNQQ SCRISNIETV IEFQQMNSRL LEITREFSVN
 241 AGVTPLSTY MLTNSSELLSL INDPITNDQ KKLMSNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPIYGVID TPCWKLHTSP LCTNIKEGS NICLTRIDRG WYCDNAGSVS FFPQADTCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVS LCNTDIFNSK YDCKIMTSKT DISSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYVYV KLEGKNLYVK GEPIINYDYP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRRS ELLHNVNTGK STTNIMITTI IIVIIVVLLS
 541 LIAIGLLLYC KAKNTPVTLK KDQLSGINNI AFSK

Secuencia de la Proteína F de MARM B2 (SEQ ID NO: 14)

1 MELLIHRSSA IFLTLAVNAL YLTSSQNITE EFYQSTCSAV SRGYFSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKETKCN GTDTKVLIK QELDKYKNAV TELQLMQNT PAANNRARRR APQYMYNTIN
 121 TTKNLNVSIS KKRKRRLFLG LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKNA LLSTNKAVVS
 181 LSNRVSVLTS KVLDLKNYIN NRLLPIVNQQ SCRISNIETV IEFQQMNSRL LEITREFSVN
 241 AGVTPLSTY MLTNSSELLSL INDPITNDQ KKLMSNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPIYGVID TPCWKLHTSP LCTNIKEGS NICLTRIDRG WYCDNAGSVS FFPQADTCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVS LCNTDIFNSK YDCKIMTSKT DISSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYVYV KLEGKNLYVK GEPIINYDYP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRRS ELLHNVNTGK STTNIMITTI IIVIIVVLLS
 541 LIAIGLLLYC KAKNTPVTLK KDQLSGINNI AFSK

5 Las mutaciones se localizaron en el aminoácido N208Y para el virus mutante MARM A1, el aminoácido N201D en el virus mutante MARM B1 y el aminoácido L204V en el virus MARM B2. Esta región (subrayada en las secuencias anteriores) es C-terminal para las repeticiones de héptadas definidas de la proteína F que son críticas para el proceso de fusión de la proteína. Esta región del epítipo D25 identificada (indicada por una flecha blanca en negra en Fig. 10B) está en la superficie de la proteína RSV-F.

10

Las secuencias se comparan en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2: Secuencias de MARM de D25 en comparación con las secuencias de proteína RSV-F de tipo silvestre (los restos mutados están en negra y subrayados)

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
RSV-F tipo silvestre A (195-228)	LKNYI DKQLL PIVNK QSCSI SNIET VIEFQ QKNN	7
RSV-F D25 MARM A1 (195-228)	LKNYI DKQLL PIV <u>Y</u> K QSCSI SNIET VIEFQ QKNN	8
RSV-F tipo silvestre B (195-228)	LKNYI NNRLI PIVNQ QSCRI SNIET VIEFQ QMNS	9
RSV-F D25 MARM B 1 (195-228)	LKNYI <u>N</u> DRLL PIVNQ QSCRI SNIET VIEFQ QMNS	10
RSV-F D25 MARM B2 (195-228)	LKNYI NNRL <u>V</u> PIVNQ QSCRI SNIET VIEFQ QMNS	11

15

Ejemplo 7

Ensayo de neutralización de los MARM de D25

20 Se realizó un ensayo de microneutralización de RSV para probar los MARM de D25 aislados. Fue un ensayo ELISA basado en células donde las células HEP-2 infectadas se tiñeron para expresión de proteínas F mutadas o de tipo silvestre y se analizaron para determinar la unión de anticuerpos.

25 Primero, el anticuerpo monoclonal motavizumab se comparó con D25 para actividad de neutralización en todos los MARM de D25 identificados. Para el ensayo de neutralización se usaron diluciones de D25 o motavizumab (1-1000 ng/ml), y el virus RSV de tipo silvestre se usó como control positivo. Como se muestra en Fig.11, motavizumab pudo neutralizar tanto los virus de RSV de tipo silvestre como todos los MARM de D25, con 100 ng/ml o menos de motavizumab (Figs. 11C y 11D), mientras que D25 solo pudo neutralizar el virus de tipo silvestre, pero ninguno de los MARM, cuando se utilizaron 1-1000 ng/ml de D25 (Figs. 11A y 11B).

30

Se realizaron experimentos similares comparando la actividad de neutralización de D25 y palivizumab. Para el ensayo de microneutralización se usaron diluciones de D25 o palivizumab (0,01 µg/ml a 10 mg/ml), y el virus RSV de tipo silvestre

se usó como control positivo. Como se muestra en Fig. 12, aproximadamente 1 µg/ml de D25 pudo neutralizar el virus de RSV de tipo silvestre, y aproximadamente 100 µg/ml de palivizumab pudieron neutralizar los tres MARM de D25. Tanto MARM B1 como MARM B2 de D25 fueron completamente insensibles a la neutralización de D25 (13B y 13C), indicando que los aminoácidos en las posiciones 201 y 204 son críticos para la unión de D25. Por otro lado, D25 fue capaz de neutralizar el MARM A2, pero a un mínimo de 100 veces la concentración más alta que la necesaria para neutralizar el A2 de tipo silvestre.

Ejemplo 8

Construcción del epítipo HR1 y SK

Como se menciona en el Ejemplo 5, la región identificada crítica para la unión de D25 es C-terminal a la HR1 definida de la proteína F que es importante para el proceso de fusión de la proteína. Por tanto, se realizó una construcción que contenía la región HR1 (Tabla 1B) para probar la unión de D25.

Además, parece que una extensión del término C y un truncamiento del término N de la héptada de repetición en una construcción restringida puede reflejar mejor la estructura de pre-fusión del epítipo D25. Esta construcción denominada epítipo SK contiene los aminoácidos 195-228 de la proteína RSV-F de A2 en el primer bucle de la construcción del nudo de calabaza (SK) del inhibidor II de tripsina de *Ecballium elaterium* (EETI-II), como se ilustra en Fig. 13. La cisteína en la posición 212 de la proteína RSV-F fue sustituida por serina.

Estas construcciones se expresaron en *E. coli* y las proteínas se purificaron para ensayos de unión.

Ejemplo 9

D25 se une más fuertemente al epítipo SK que a la región HR1

El Análisis de Interometría de Biocapa se realizó para comparar la afinidad de unión de D25 con el epítipo SK y con la región HR1. D25 se aplicó a un sensor de captura de Fc de IgG antihumana a concentraciones que variaban de 1,5625 nM a 100 nM. Los sensores se trasladaron a un tampón cinético para establecer un valor inicial y luego se trasladaron a un pocillo que contenía el fragmento HR1 o la construcción del epítipo SK.

Como se muestra en Fig. 14, D25 se unió a HR1 y al epítipo SK de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, D25 mostró una mayor afinidad por el epítipo SK que por HR1, como lo indican los valores calculados de K_D (58,5 pM para el epítipo SK frente a 1,9 nM por HR1).

LISTA DE SECUENCIAS

[0095]

- 5 <110> ULBRANDT, NANCY
 <120> EPITOPOS DE PROTEINA F DEL VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO
 <130> RSVNG-102W01
 <140> 61/783.380
 <141> 14-03-2013
- 10 <160> 14
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 574
 <212> PRT
- 15 <213> Virus sincitial respiratorio
 <220>
 <223> subtipo A2 de RSV, proteína F
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Leu | Leu | Ile | Leu | Lys | Ala | Asn | Ala | Ile | Thr | Thr | Ile | Leu | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Val | Thr | Phe | Cys | Phe | Ala | Ser | Gly | 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 | Lys |
| 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 | Pro | Pro | Thr | Asn | Asn | Arg | Ala | Arg | Arg | Glu | Leu | Pro |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arg | Phe | Met | Asn | Tyr | Thr | Leu | Asn | Asn | Ala | 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 | Val | Ala | Val | Ser | Lys | Val | Leu | His | Leu |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |

ES 2 778 899 T3

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
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser 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
 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 Ile 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

ES 2 778 899 T3

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 Met 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 Asn 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> 574

<212> PRT

5 <213> Virus sincitial respiratorio

<220>

<223> subtipo B de RSV, cepa 18537, proteína F

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

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

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

ES 2 778 899 T3

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

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
 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 Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
 100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
 115 120 125

Ile 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 Asn 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

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

ES 2 778 899 T3

290

295

300

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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

Pro Gln Ala Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

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

Asp Ile 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 Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

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

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

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

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

<210> 3

5 <211> 142

ES 2 778 899 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo A2 de RSV sintético, proteína F

5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (25)..(83)
 <223> Región HR1
 <220>

10 <221> característica miscelánea
 <222> (98)..(142)
 <223> Región HR2
 <400> 3

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

15 <210> 4
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo A2 de RSV sintético, proteína F
 <220>
 <221> característica miscelánea

<222> (25)..(83)

<223> Región HR1

<400> 4

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15

Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
20 25 30

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
35 40 45

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
50 55 60

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
65 70 75 80

Lys Gln Ser

5 <210> 5

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo A2 de RSV sintético, proteína F, SK-Epítopo

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (19)..(35)

15 <223> Región HR1

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (17)..(52)

20 <223> Epítopo que sustituye el bucle inhibidor del inhibidor II de tripsina de Ecballium elaterium (EETI-II)

<400> 5

ES 2 778 899 T3

Gln Pro Ala Met Ala Met Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro Gly Cys
1 5 10 15

Glu Phe Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
20 25 30

Lys Gln Ser Ser Ser Ile Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln
35 40 45

Gln Lys Asn Asn Leu Gln Cys Lys Gln Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly
50 55 60

Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys Gly Val Asp Lys Leu Ala Ala
65 70 75 80

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

Ala Leu Glu His His His His His His
1 5

10 <210> 7

<211> 34

<212> PRT

<213> Virus sincitial respiratorio

<220>

15 <223> A tipo silvestre de RSV, proteína F

<400> 7

Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln
1 5 10 15

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

Asn Asn

<210> 8

<211> 34

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo A de RSV sintético, proteína F, mutante resistente a anticuerpo monoclonal D25 (MARM) A1

25 <400> 8

ES 2 778 899 T3

Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Tyr Lys Gln
 1 5 10 15

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

Asn Asn

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Virus sincitial respiratorio

<220>

<223> B tipo silvestre de RSV, proteína F

<400> 9

Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn Gln Gln
 1 5 10 15

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

Asn Ser

10 <210> 10

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo B de RSV sintético, proteína F, mutante resistente a anticuerpo monoclonal D25 (MARM) B1

<400> 10

Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asp Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn Gln Gln
 1 5 10 15

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

Asn Ser

<210> 11

20 <211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo B de RSV sintético, proteína F, mutante resistente a anticuerpo monoclonal D25 (MARM) B2

<400> 11

ES 2 778 899 T3

Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Val Pro Ile Val Asn Gln Gln
 1 5 10 15

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

Asn Ser

<210> 12

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo A de RSV sintético, proteína F, mutante resistente a anticuerpo monoclonal D25 (MARM) A1

<220>

10 <221> SEÑAL

<222> (1)..(28)

<223> péptido señal

<220>

<221> característica miscelánea

15 <222> (195)..(228)

<223> epítipo conformacional en la proteína F A2 de RSV de tipo silvestre

<400> 12

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

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly 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 Lys
 65 70 75 80

ES 2 778 899 T3

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

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

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala 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 Val 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

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Tyr
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Ala 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

ES 2 778 899 T3

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

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 Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Ile 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> 13

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo B de RSV sintético, proteína F, mutante resistente a anticuerpo monoclonal D25 (MARM) B1

<220>

<221> SEÑAL
 <222> (1)..(22)
 <223> péptido señal
 <220>

5 <221> característica miscelánea
 <222> (195)..(228)
 <223> epítipo conformacional en la proteína F de RSV de tipo silvestre
 <400> 13

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	His	Arg	Ser	Ser	Ala	Ile	Phe	Leu	Thr	Leu	Ala
1				5					10					15	
Val	Asn	Ala	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ser	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Arg	Gly	Tyr	Phe	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	Thr	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Thr	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
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	Asn	Thr	Pro	Ala	Ala	Asn	Asn	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Ala	Pro
			100					105					110		
Gln	Tyr	Met	Asn	Tyr	Thr	Ile	Asn	Thr	Thr	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Ser
		115					120					125			
Ile	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	Asn	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys
				165					170					175	

10

ES 2 778 899 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 Asn Asp Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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

Pro Gln Ala Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

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

Asp Ile 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

ES 2 778 899 T3

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 Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

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

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

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

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

<210> 14

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Subtipo B de RSV sintético, proteína F, mutante resistente a anticuerpo monoclonal D25 (MARM) B2

<220>

10 <221> SEÑAL

<222> (1)..(22)

<223> péptido señal

<220>

<221> característica miscelánea

15 <222> (195)..(228)

<223> epítipo conformacional en la proteína F de RSV de tipo silvestre

<400> 14

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

ES 2 778 899 T3

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

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

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
 115 120 125

Ile 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 Asn 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

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Val Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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

ES 2 778 899 T3

260	265	270																				
Leu	Met	Ser	Ser	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											
Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro							
305					310					315					320							
Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Ile	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								
Pro	Gln	Ala	Asp	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	Ser	Leu	Cys	Asn	Thr							
		370				375						380										
Asp	Ile	Phe	Asn	Ser	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Met	Thr	Ser	Lys	Thr							
385					390					395					400							
Asp	Ile	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	Leu	Glu	Gly							
		450				455					460											
Lys	Asn	Leu	Tyr	Val	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Ile	Asn	Tyr	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	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu							
			500					505					510									

ES 2 778 899 T3

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

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

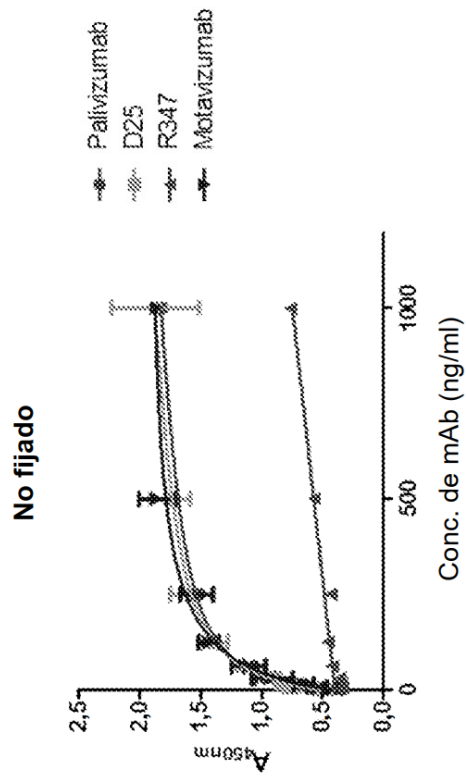
Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión aislada, comprendiendo la proteína de fusión un fragmento de proteína F del RSV y una proteína no RSV,
en donde el fragmento de proteína F del RSV consiste en los aminoácidos 195 a 228 de SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 195 a 228 de SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 7, o los aminoácidos 1 a 34 de SEQ ID NO: 9,
en donde la proteína no RSV comprende el inhibidor II de tripsina de *Ecballium elaterium* (EETI-II) inhibidor de proteasa de la familia de la calabaza,
10 en donde el bucle inhibidor de EETI-II se reemplaza por el fragmento de proteína F del RSV y
en donde la proteína de fusión está limitada en una conformación que puede unirse específicamente mediante el anticuerpo monoclonal D25 o un fragmento, variante, análogo o derivado de unión a antígeno del mismo.
- 15 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la cisteína correspondiente a la posición 212 del aminoácido de la proteína RSV-F se sustituye con una serina.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 20 4. Un polinucleótido aislado que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4, o el vector de la reivindicación 5.
- 25 7. Una composición inmunogénica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo.
- 30 8. Un método para identificar un anticuerpo de proteína F anti-RSV, que comprende identificar una biblioteca de anticuerpos para un anticuerpo que se une a la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, pero que no se une a la proteína no RSV sola.

A.



B.

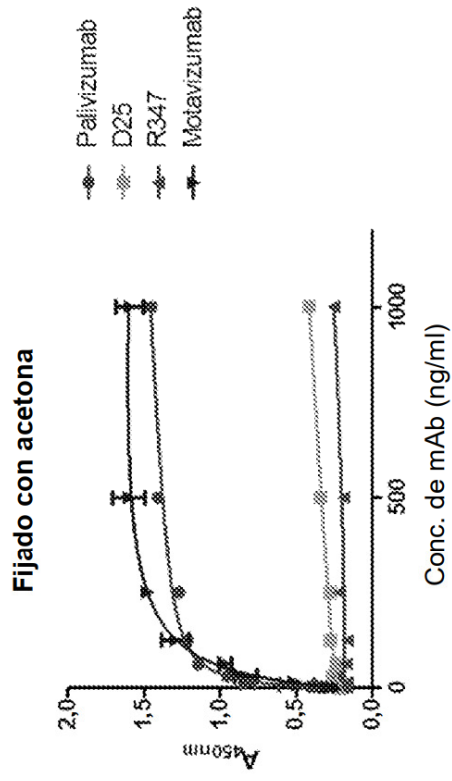
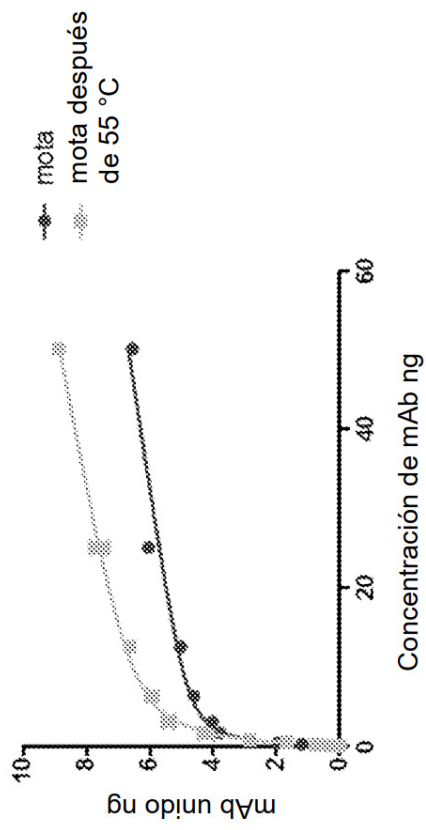


Figura 1

A.



B.

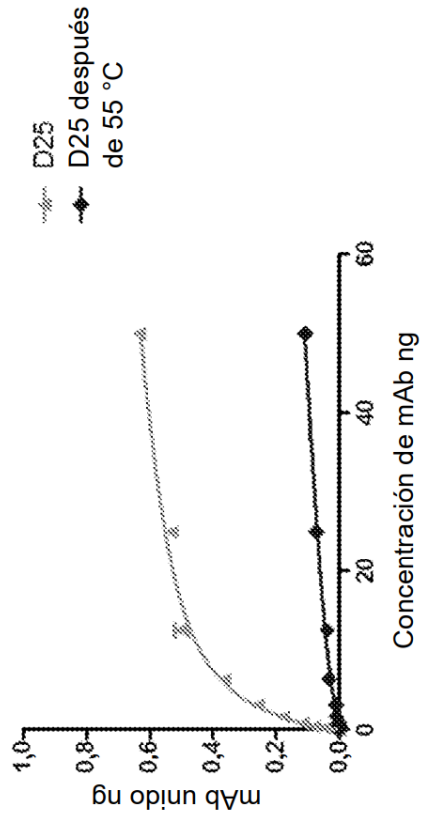


Figura 2

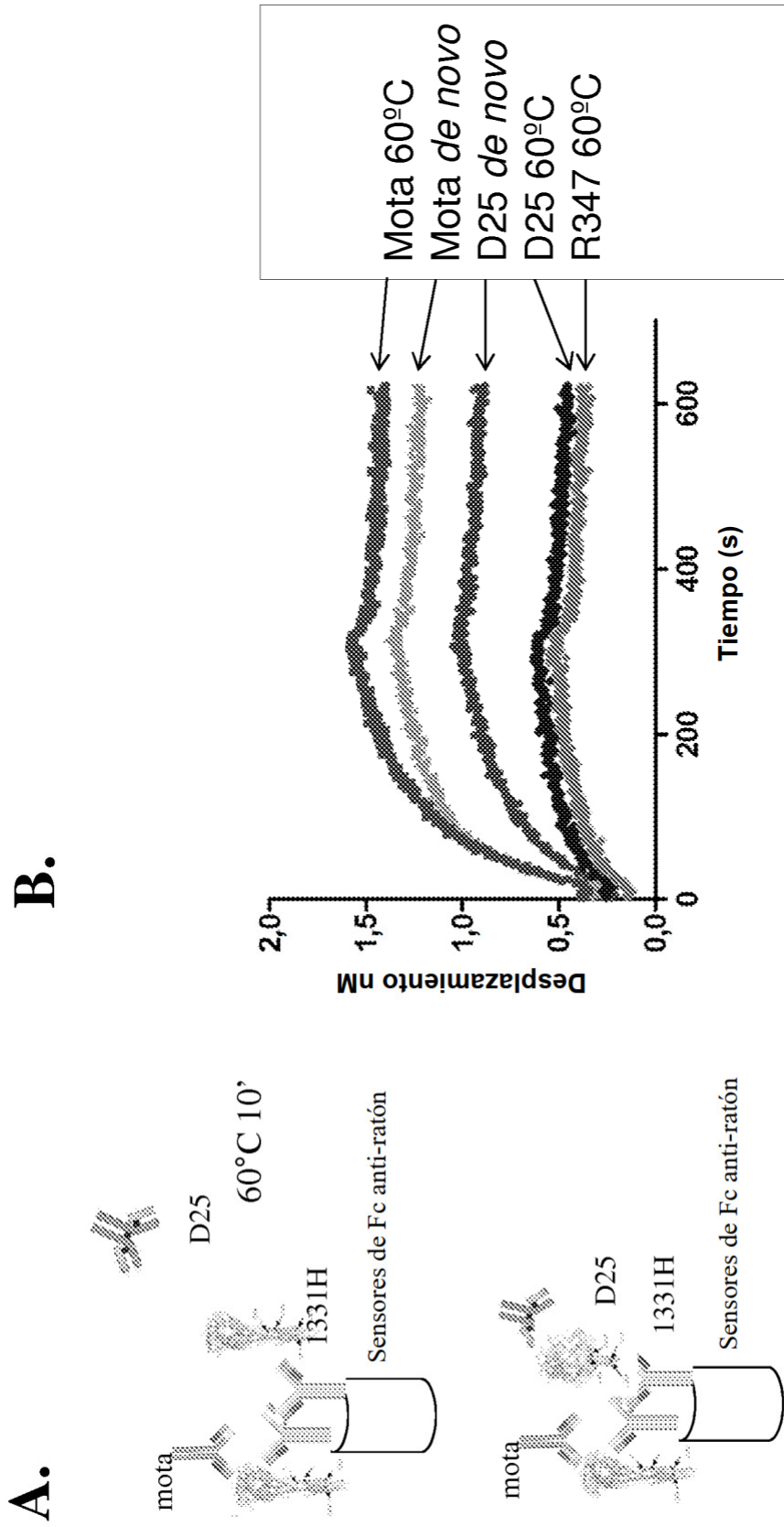


Figura 3

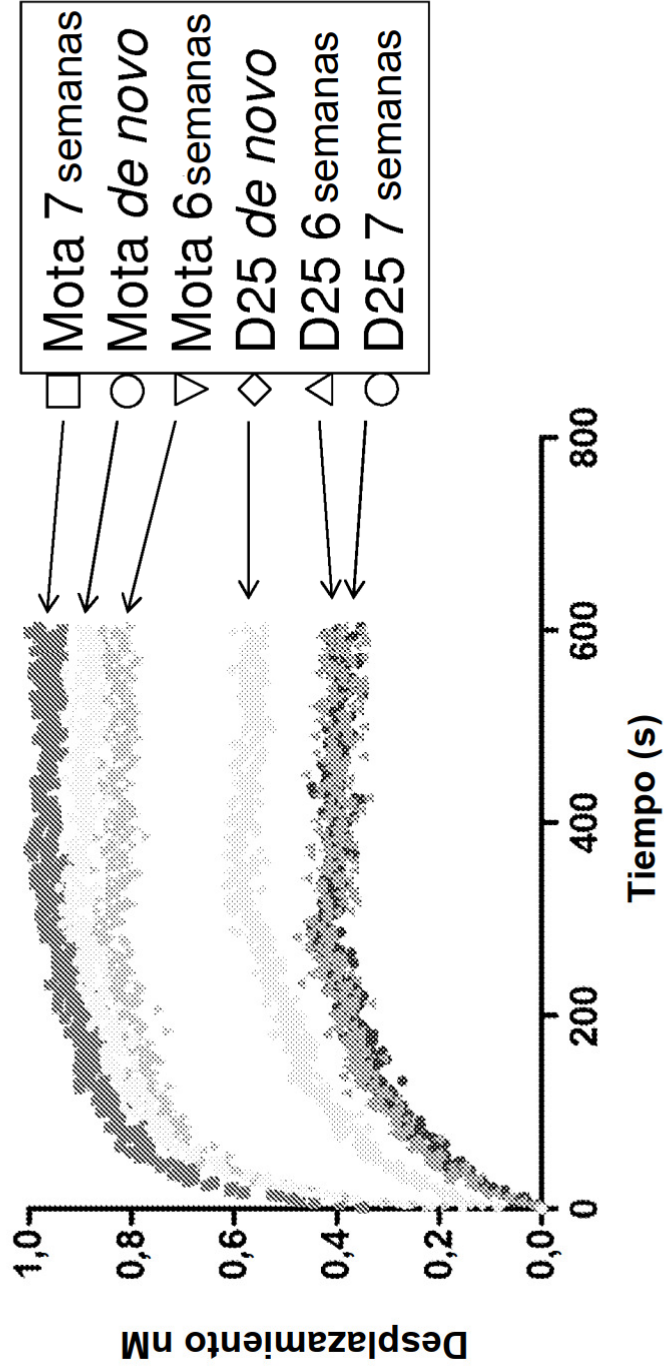


Figura 4

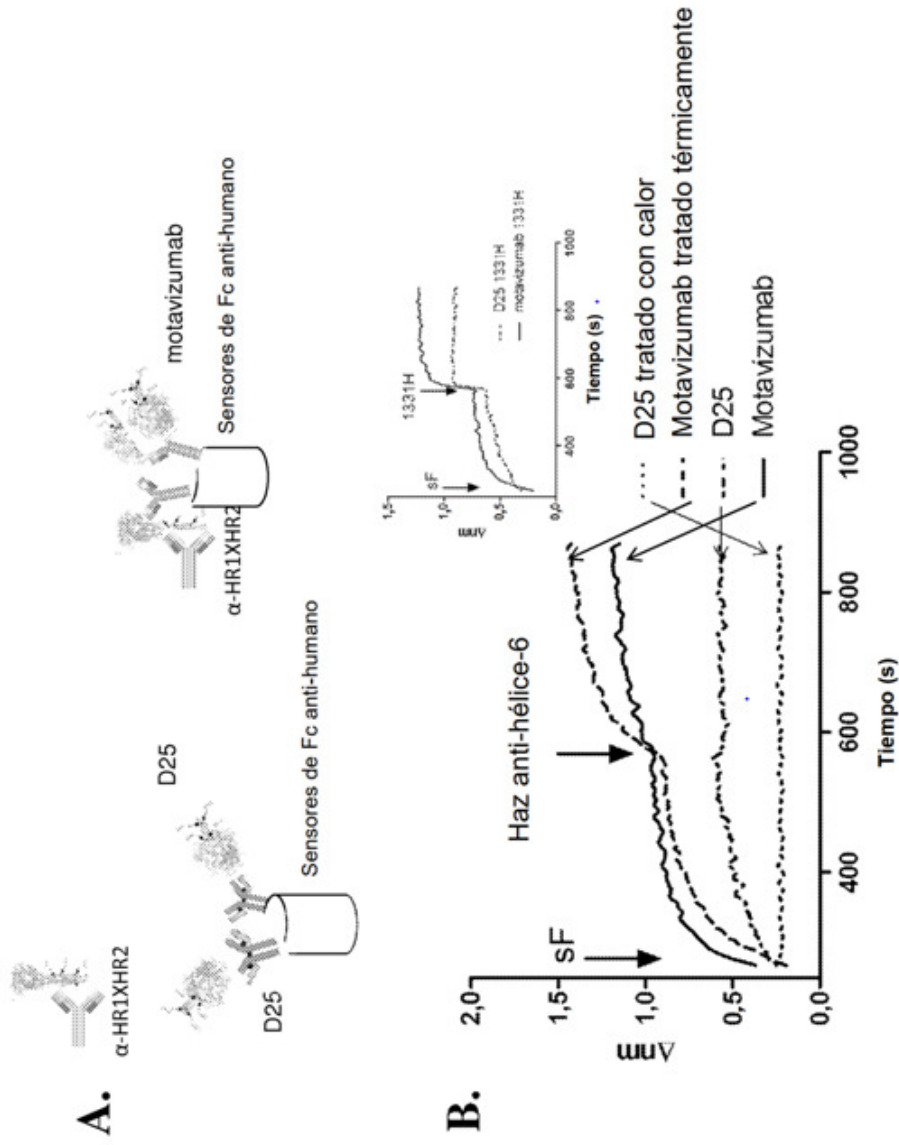


Figura 5

Sitios anti génicos en RSV-F

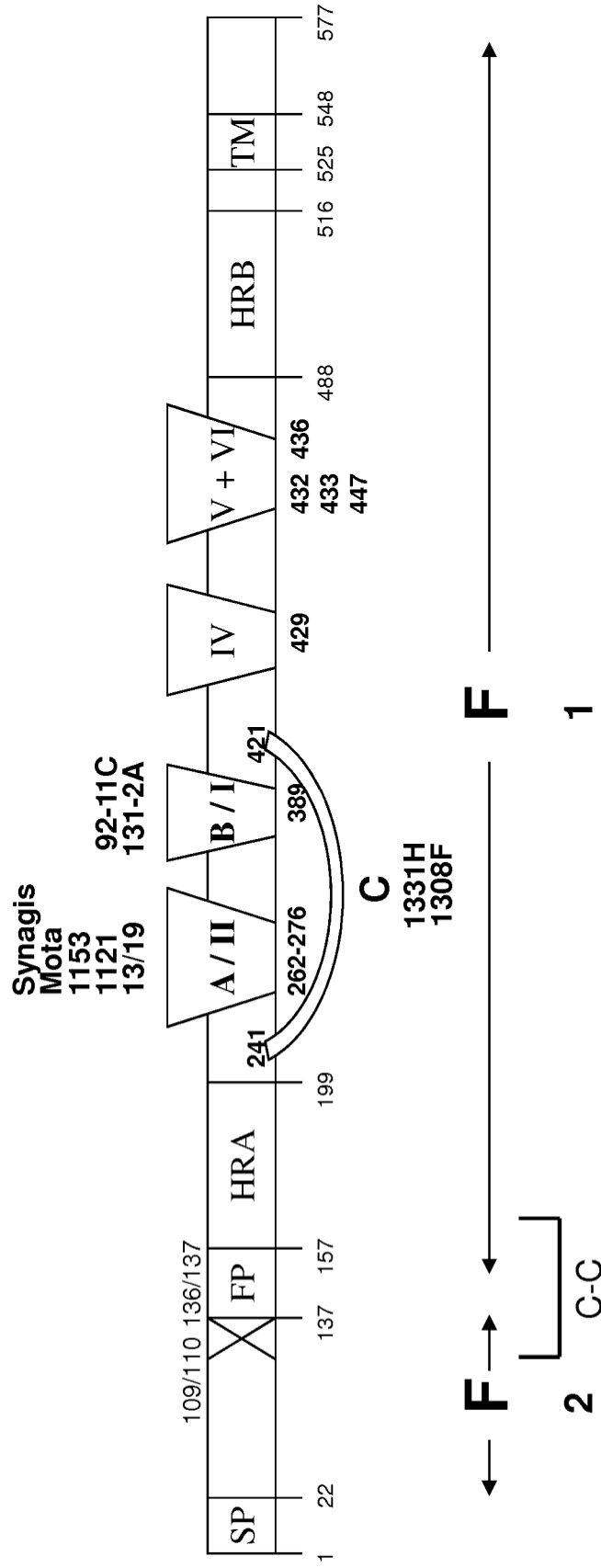
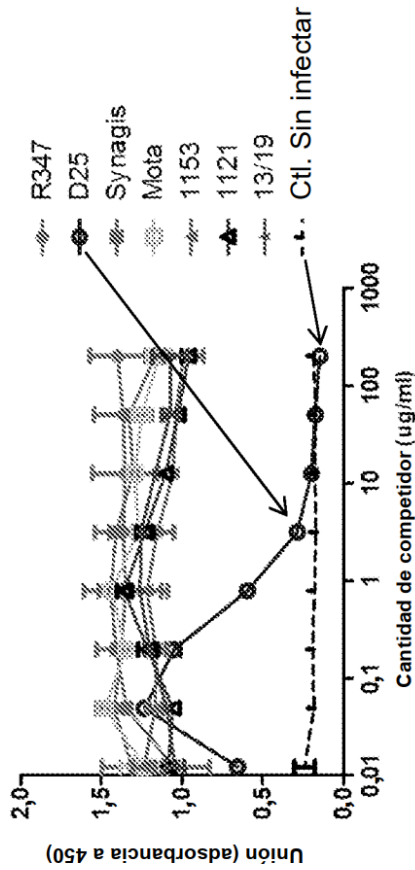


Figura 6

A.

Sitio A/II ensayo de competición
(D25 biotina a 100 ng/ml constante)



B.

Sitio B/I ensayo de competición
(D25 biotina a 100 ng/ml constante)

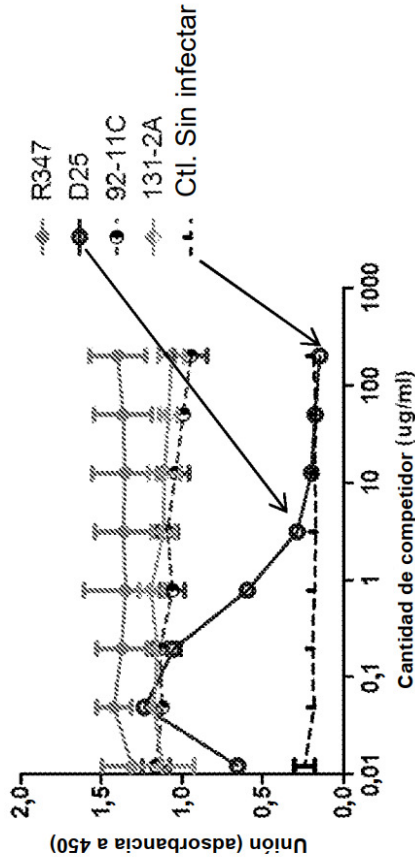
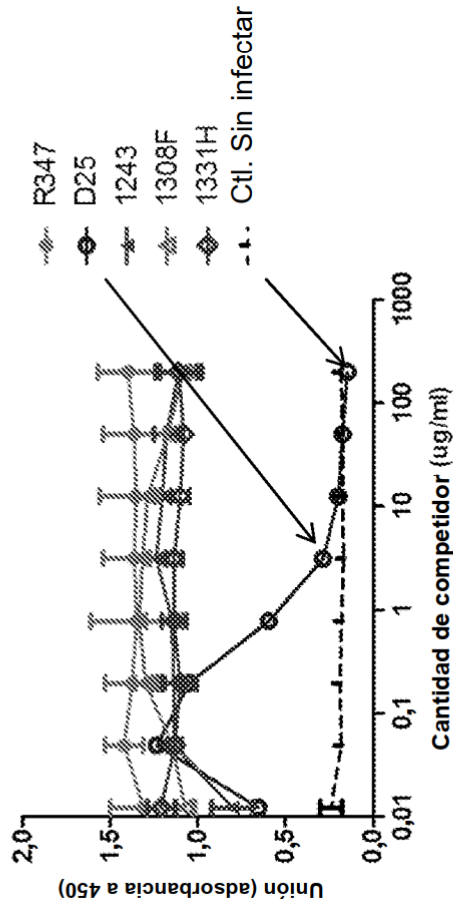


Figura 7

C.

Sitio C ensayo de competición
(D25 biotina a 100 ng/ml constante)



D.

Sitio desconocido ensayo de competición
(D25 biotina a 100 ng/ml constante)

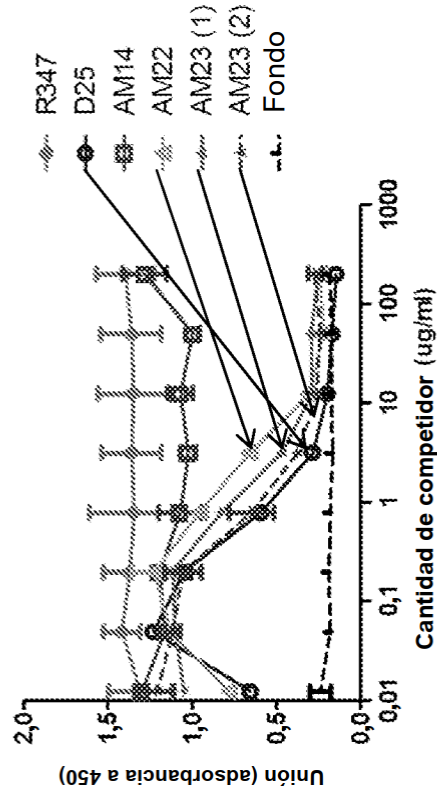


Figura 7 (continuación)

Sitio de unión a AM 23

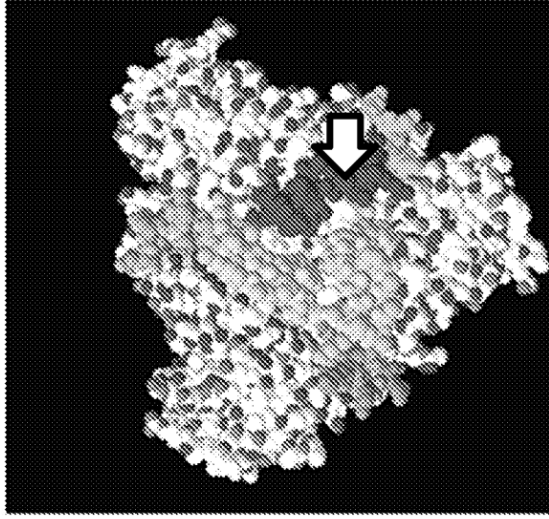
	F2				Péptido suprimido												F1						
	45	67	79	115	118	124	125	152	197	202	209	215	226	276	278	326	470	517					
9320	F	T	I	M	T	N	L	I	S	Q	Q	S	K	S	V	I	K	N					
18537	F	T	I	M	T	N	L	I	N	R	Q	S	M	S	V	I	K	N					
B1					I				N	Q			K										
B5									N	Q			K		A	T							
B15									N	Q	K		K		A								
B28									N	Q			K		A	T							
B31									Figura 8									K					
A2	L	N	I	M	T	K	T	V	N	Q	K	S	K	N	V	T	K	N					

Secuencias de RSV en el sitio antigénico propuesto

195-	L	K	N	Y	I	D	K	Q	L	L	P	I	V	N	K	Q	S	C	S	I	S	-215	RSV-A2
	L	K	N	Y	I	D	K	Q	L	L	P	I	V	N	K	Q	S	C	S	I	S		RSV MARM A1-A5
	L	K	N	Y	I	N	D	R	L	L	P	I	V	N	Q	Q	S	C	R	I	S		RSV MARM B1
	L	K	N	Y	I	N	N	R	L	V	P	I	V	N	Q	Q	S	C	R	I	S		RSV MARM B2/B3
195-	L	K	N	Y	I	N	N	R	L	L	P	I	V	N	Q	Q	S	C	R	I	S	-215	RSV-B18537

Figura 9

B.



A.

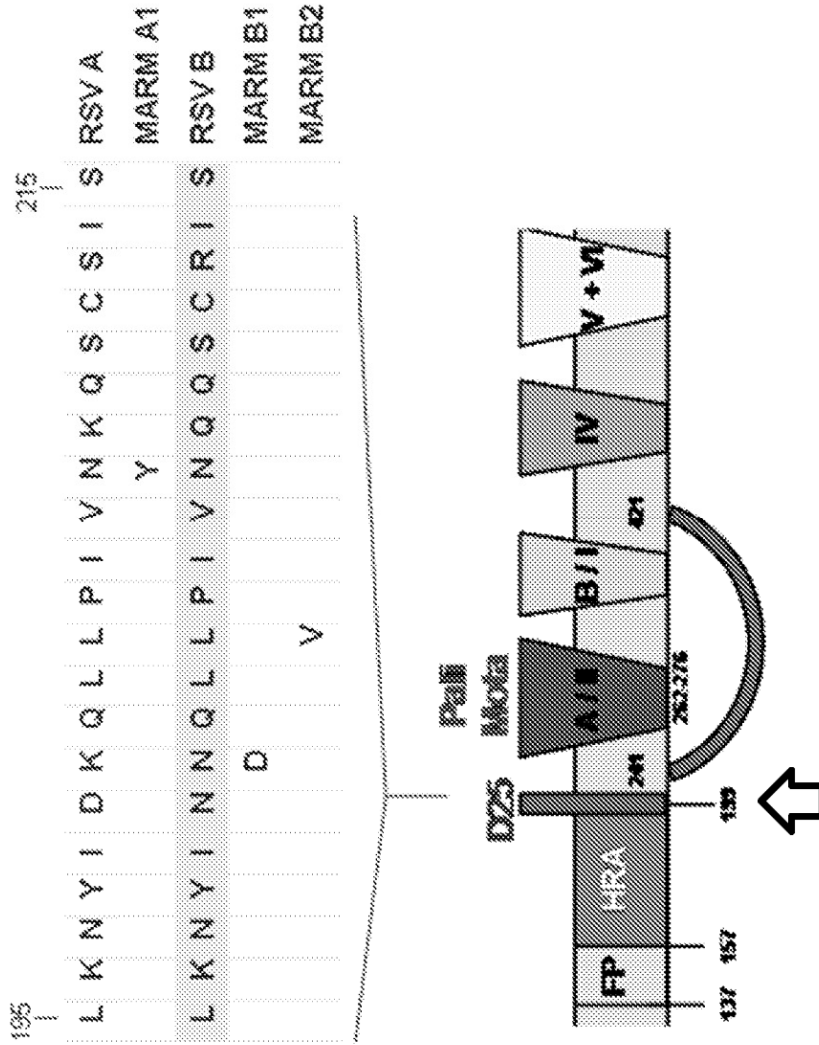


Figura 10

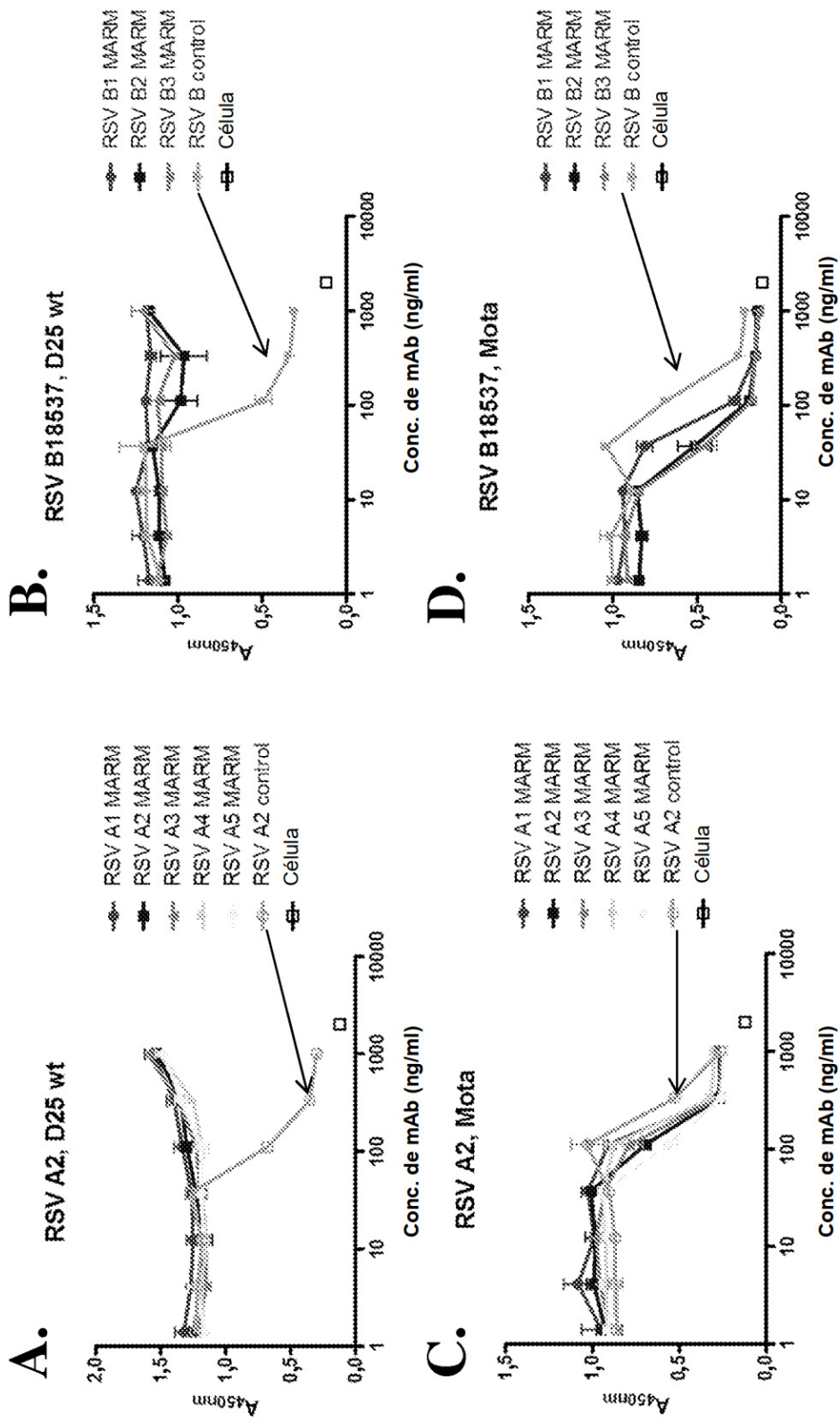


Figura 11

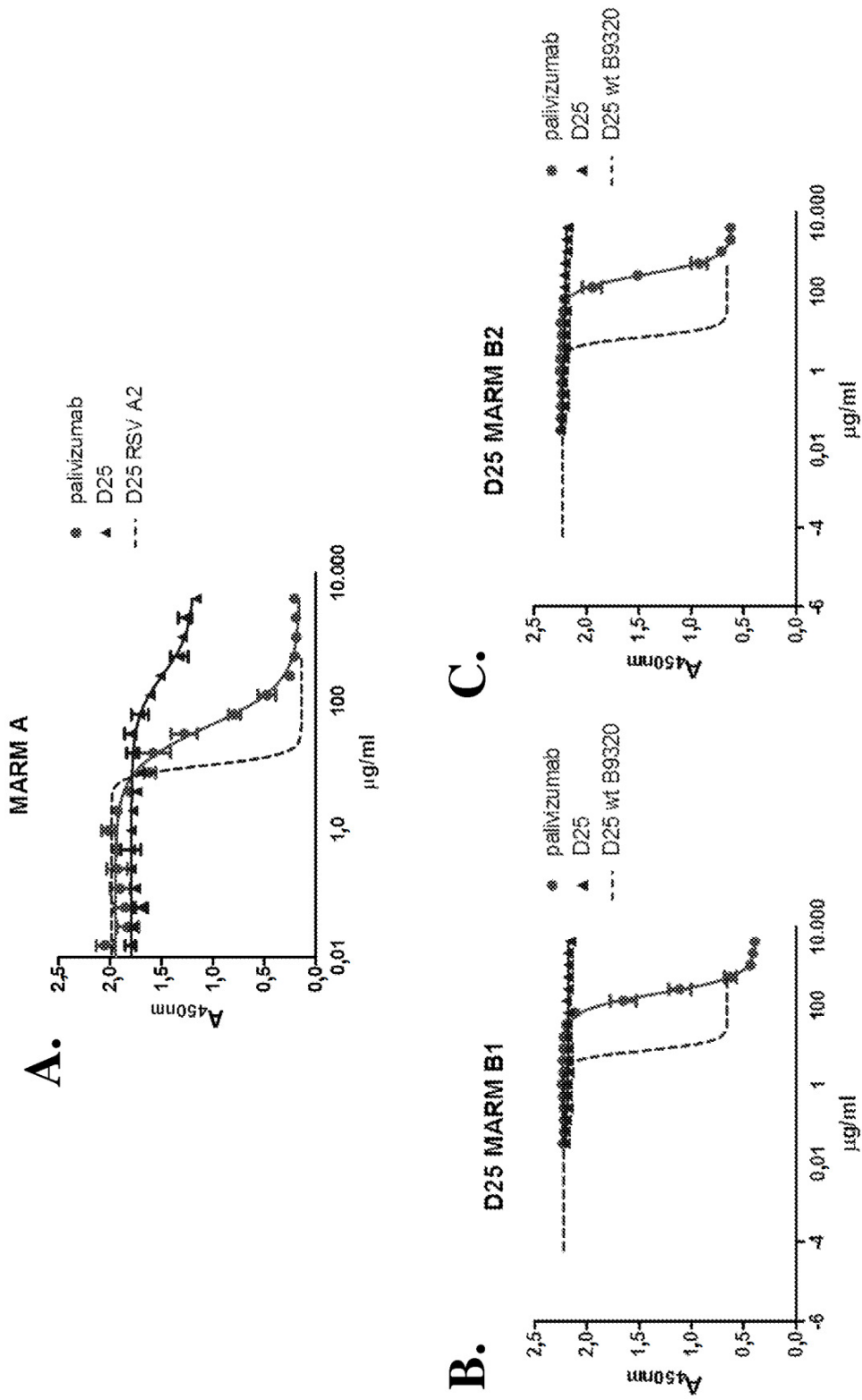


Figura 12

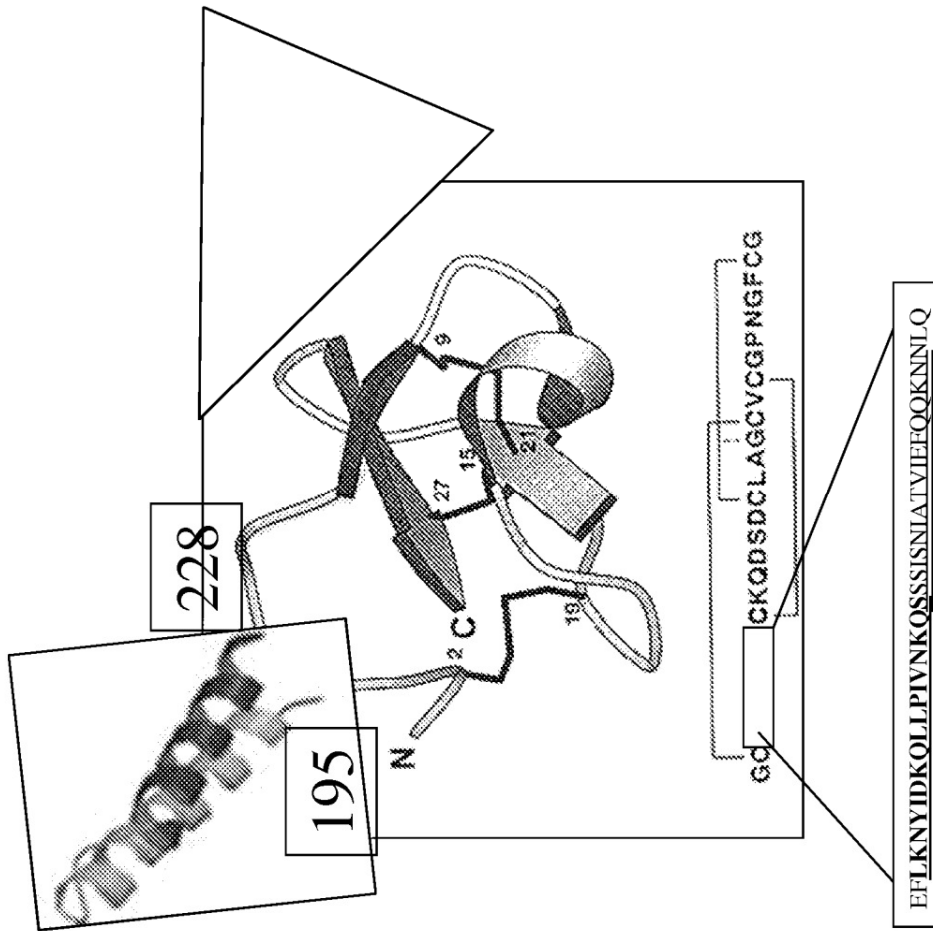
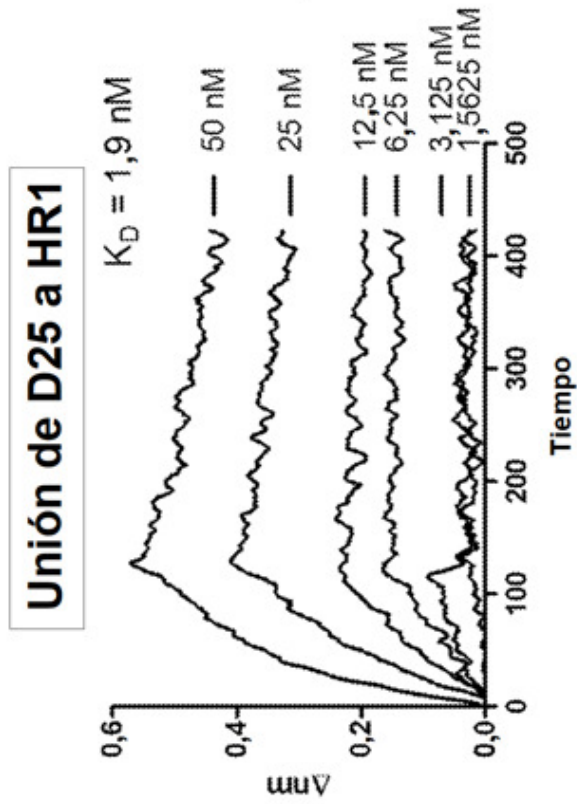


Figura 13

A.



B.

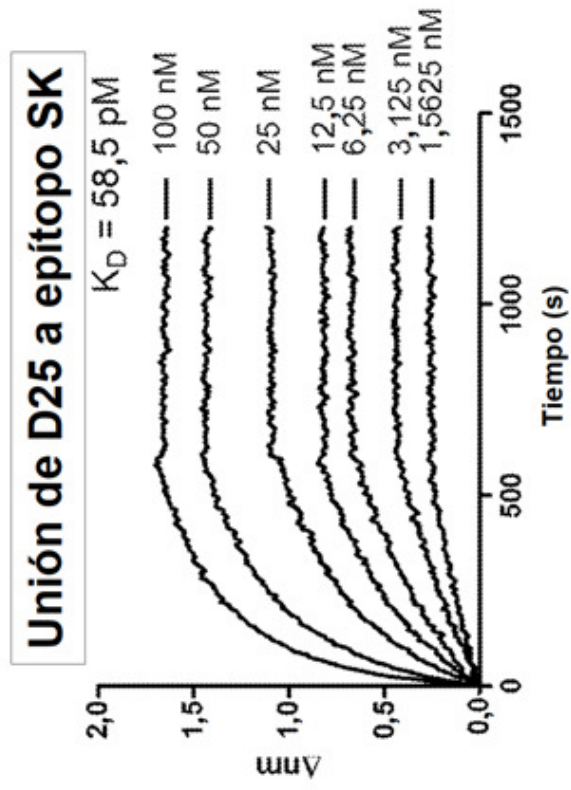


Figura 14