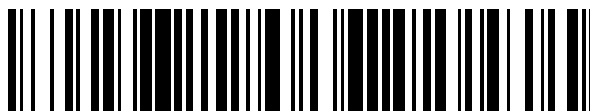


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 725**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009** **E 16166033 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3067064**

54 Título: **Proteínas F del RSV modificadas y métodos de su uso**

30 Prioridad:

09.12.2008 US 121126 P

14.04.2009 US 169077 P

10.07.2009 US 224787 P

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

30.11.2020

73 Titular/es:

NOVAVAX, INC. (100.0%)

21 Firstfield Rd

Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

PUSHKO, PETER;

WU, YINGYUN;

MASSARE, MICHAEL;

LIU, YE;

SMITH, GALE y

ZHOU, BIN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 796 725 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

Proteínas F del RSV modificadas y métodos de su uso

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere, en líneas generales, a proteínas de fusión (F) del virus sincitial respiratorio modificadas o mutadas y a métodos para fabricarlas y usarlas, incluyendo composiciones inmunogénicas tales como vacunas para el tratamiento y/o la prevención de infección por RSV.

Antecedentes de la invención

10 El virus sincitial respiratorio (RSV, *Respiratory Syncytial Virus*) es un miembro del género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*. El RSV humano (HRSV) es la causa principal de enfermedad grave del tracto respiratorio inferior en niños pequeños y es responsable de una morbilidad y mortalidad considerables en seres humanos. El RSV también está reconocido como un agente importante de enfermedad en adultos inmunocomprometidos y en ancianos. Debido a la resistencia incompleta a RSV en el hospedador infectado después de una infección natural, el RSV puede infectar múltiples veces durante la niñez y la vida adulta.

15 Este virus tiene un genoma compuesto por un ARN con una única hebra de sentido negativo, que está estrechamente asociado con la proteína vírica para formar la nucleocápsida. La envuelta vírica está compuesta por una membrana plasmática derivada de la bicapa lipídica que contiene proteínas estructurales codificadas por el virus. Se empaqueta una polimerasa vírica con el virión y transcribe el ARN genómico en ARNm. El genoma del RSV codifica tres proteínas estructurales transmembrana, F, G, y SH, dos proteínas de matriz, M y M2, tres proteínas de nucleocápsida N, P, y L, y dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2.

20 Se cree que la fusión del HRSV y de las membranas celulares sucede en la superficie celular y es una etapa necesaria para la transferencia de ribonucleoproteína vírica al citoplasma celular durante las fases prematuras de la infección. Este proceso está mediado por la proteína de fusión (F), que también promueve la fusión de la membrana de células infectadas con la de células adyacentes para formar un sincitio característico, que es tanto un efecto citopático prominente como un mecanismo adicional de propagación vírica. Por consiguiente, la neutralización de la actividad de fusión es importante en la inmunidad del hospedador. De hecho, anticuerpos monoclonales desarrollados contra la proteína F han demostrado neutralizar la infectividad del virus e inhibir la fusión de la membrana (Calder et al., 2000, Virology 271: 122-131).

25 La proteína F del RSV comparte características estructurales e identidad limitada, aunque significativa, de secuencia de aminoácidos con glucoproteínas F de otros paramixovirus. Se sintetiza como un precursor inactivo de 574 aminoácidos (F0) que se glucosila de forma cotraduccional en asparaginas en el retículo endoplasmático, donde se ensambla en homo-oligómeros. Antes de alcanzar la superficie celular, el precursor F0 se escinde por una proteasa en F2 desde el extremo N-terminal y F1 desde el extremo C-terminal. Las cadenas F1 y F2 permanecen unidas covalentemente por uno o más enlaces disulfuro.

30 Se ha descubierto que se acumulan proteínas F de longitud completa purificadas por inmunoafinidad en forma de micelas (también caracterizadas como rosetas) similares a las observadas con otras glicoproteínas de membrana víricas de longitud completa (Wrigley et al., 1986, en *Electron Microscopy of Proteins*, Vol. 5, pág. 103-163, Academic Press, Londres). Bajo microscopía electrónica, las moléculas en las rosetas aparecen como varillas con forma de cono invertido (~70 %) o estructuras con forma de piruleta (~30 %) con sus extremos más anchos proyectándose desde los centros de las rosetas. El estado conformacional de varilla está asociado con una glucoproteína F en el estado inactivado prefusión mientras que el estado conformacional de piruleta está asociado con una glucoproteína F en el estado activo postfusión.

35 Puede usarse micrografía electrónica para distinguir entre las conformaciones prefusión y postfusión (denominadas de forma alternativa prefusogénica y fusogénica), como se demuestra por Calder et al., 2000, Virology 271:122-131. La conformación prefusión también puede distinguirse de la conformación fusogénica (postfusión) por ensayos de asociación de liposomas. Adicionalmente, las conformaciones prefusión y fusogénicas pueden distinguirse usando anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que reconocen específicamente epítopos conformacionales presentes en una u otra de las formas prefusión o fusogénica de la proteína F del RSV, pero no en la otra forma. Dichos epítopos conformacionales pueden deberse a exposición preferente de un determinante antigénico sobre la superficie de la molécula. Como alternativa, pueden surgir epítopos conformacionales de la yuxtaposición de aminoácidos que no están contiguos en el polipéptido lineal.

40 Se ha demostrado previamente que el precursor F se escinde en dos sitios (sitio I, después del resto 109 y sitio II, después del resto 136), ambos precedidos por motivos reconocidos por proteasas tipo furina. El sitio II está adyacente a un péptido de fusión, y la escisión de la proteína F en ambos lados es necesaria para la fusión de la membrana (Gonzalez-Reyes et al., 2001, PNAS 98(17): 9859-9864). Cuando se completa la escisión en ambos lados, se cree que hay una transición de varillas con forma de cono a varillas con forma de piruleta.

Sumario de la invención

En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión del virus sincitial respiratorio de acuerdo con la reivindicación 1.

Como se describe en este documento, los presentes inventores han descubierto que pueden conseguirse niveles sorprendentemente altos de expresión de la proteína de fusión (F) cuando se hacen ciertas modificaciones en la estructura de la proteína F del RSV. Dichas modificaciones también reducen inesperadamente la toxicidad celular de la proteína F del RSV en una célula hospedadora. Además, las proteínas F modificadas de la presente invención muestran una capacidad mejorada de mostrar la morfología de "piruleta" postfusión en oposición a la morfología de "varilla" prefusión. Por tanto, en un aspecto, las proteínas F modificadas de la presente invención también pueden mostrar inmunogenicidad mejorada en comparación con proteínas F de tipo silvestre. Estas modificaciones tienen aplicaciones significativas al desarrollo de vacunas y métodos de uso de dichas vacunas para el tratamiento o prevención del RSV. La presente invención proporciona proteínas F recombinantes del RSV que muestran expresión aumentada, toxicidad celular reducida, y/o propiedades inmunogénicas potenciadas en comparación con proteínas F de tipo silvestre del RSV.

Se divulgan en este documento proteínas F recombinantes del RSV que comprenden secuencias modificadas o mutadas de aminoácidos en comparación con proteínas F de tipo silvestre del RSV. En general, estas modificaciones o mutaciones aumentan la expresión, reducen la toxicidad celular, y/o potencian las propiedades inmunogénicas de las proteínas F del RSV en comparación con proteínas F de tipo silvestre del RSV. En ciertas realizaciones de ejemplos, las proteínas F del RSV son proteínas F del RSV humano.

La proteína F del RSV comprende preferiblemente una secuencia modificada o mutada de aminoácidos en comparación con la proteína F de tipo silvestre del RSV (por ejemplo, como se ejemplifica en la SEQ ID NO: 2). En un ejemplo, la proteína F del RSV contiene una modificación o mutación en el aminoácido correspondiente a la posición P102 de la proteína F de tipo silvestre del RSV (SEQ ID NO: 2). En otro ejemplo, la proteína F del RSV contiene una modificación o mutación en el aminoácido correspondiente a la posición I379 de la proteína F de tipo silvestre del RSV (SEQ ID NO: 2). En otro ejemplo, la proteína F del RSV contiene una modificación o mutación en el aminoácido correspondiente a la posición M447 de la proteína F de tipo silvestre del RSV (SEQ ID NO: 2).

En un ejemplo, la proteína F del RSV contiene dos o más modificaciones o mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente. En otro ejemplo, la proteína F del RSV contiene tres modificaciones o mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente.

La divulgación está dirigida a proteínas F del RSV en las que la prolina en la posición 102 está reemplazada por alanina. La divulgación está dirigida a proteínas F del RSV en las que la isoleucina en la posición 379 está reemplazada por valina. La divulgación está dirigida a proteínas F del RSV en las que la metionina en la posición 447 está reemplazada por valina. En ciertos ejemplos, la proteína F del RSV contiene dos o más modificaciones o mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas. En las realizaciones, la proteína F del RSV contiene tres modificaciones o mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas en estas realizaciones específicas. En un ejemplo, la proteína del RSV tiene la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 4.

En una realización, la secuencia codificante de la proteína F del RSV se optimiza adicionalmente para que potencie su expresión en una célula hospedadora adecuada. En una realización, la célula hospedadora es una célula de insecto. En una realización de ejemplo, la célula de insecto es una célula Sf9.

En un ejemplo, la secuencia codificante del gen F del RSV de codones optimizados es la SEQ ID NO: 3. En otro ejemplo, la proteína F del RSV de codones optimizados tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4.

En una realización, la proteína F del RSV comprende adicionalmente al menos una modificación en el sitio poli(A) de críptico F2. En otra realización, la proteína F del RSV comprende adicionalmente una o más mutaciones de aminoácidos en el sitio de escisión (CS) principal. En las realizaciones, la proteína F del RSV contiene una modificación o mutación en el aminoácido correspondiente a la posición R133, de la proteína F del RSV de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) o la proteína F del RSV de codones optimizados (SEQ ID NO: 4). En las realizaciones, la proteína F del RSV contiene una modificación o mutación en el aminoácido correspondiente a la posición R135 de la proteína F del RSV de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) o la proteína F del RSV optimizada por codón (SEQ ID NO: 4). En las realizaciones, la proteína F del RSV contiene una modificación o mutación en el aminoácido correspondiente a la posición R136 de la proteína F del RSV de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) o la proteína F del RSV de codones optimizados (SEQ ID NO: 4).

En una realización específica, la divulgación está dirigida a proteínas F del RSV en las que la arginina en la posición 133 está reemplazada por glutamina.

En otra realización específica, la divulgación está dirigida a proteínas F de RSV en las que la arginina en la posición 135 está reemplazada por glutamina.

En aún otra realización específica, la divulgación está dirigida a proteínas F del RSV en las que la arginina en la posición 136 está reemplazada por glutamina. En ciertos ejemplos, la proteína F del RSV contiene dos o más

modificaciones o mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas en estas realizaciones específicas. En las realizaciones, la proteína F del RSV contiene tres modificaciones o mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas en estas realizaciones específicas. En un ejemplo, la proteína RSV tiene la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 6.

- 5 En las realizaciones, la proteína F del RSV comprende adicionalmente una delección en la mitad N-terminal del dominio de fusión correspondiente a los aminoácidos 137-146 de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 6. En una realización de ejemplo, la proteína F del RSV tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 8. En un ejemplo alternativo, la proteína F del RSV tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 10.

- 10 Adicionalmente incluidas dentro del alcance de la invención están las proteínas F del RSV, distintas de la proteína F del RSV humana (SEQ ID NO: 2), que contienen alteraciones correspondientes a las establecidas en la reivindicación 1. Tales proteínas F del RSV pueden incluir, pero no están limitadas a, las proteínas F de RSV de cepas A de RSV humano, cepas B de RSV humano, cepas de RSV bovino y cepas de RSV aviar.

- 15 En algunas realizaciones, la invención está dirigida a proteínas F modificadas o mutadas del RSV de la invención que demuestran expresión aumentada en una célula hospedadora en comparación con proteínas F de tipo silvestre del RSV, tal como la mostrada por la SEQ ID NO: 2.

- 20 En otras realizaciones, la invención está dirigida a proteínas F modificadas o mutadas del RSV de la invención que demuestran toxicidad celular reducida en una célula hospedadora en comparación con proteínas F de tipo silvestre del RSV, tal como la mostrada por la SEQ ID NO: 2. En aún otras realizaciones, la invención está dirigida a proteínas F modificadas o mutadas del RSV de la invención que demuestran propiedades inmunogénicas potenciadas en comparación con proteínas F de tipo silvestre del RSV, tal como la mostrada por la SEQ ID NO: 2.

En aspectos adicionales, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden una o más proteínas F modificadas o mutadas del RSV de la invención. En una realización, la divulgación proporciona una micela compuesta de una o más proteínas F modificadas o mutadas del RSV de la invención (por ejemplo, una micela F del RSV).

- 25 En otra realización, la presente divulgación proporciona una partícula tipo virus (VLP) que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En algunas realizaciones, la VLP comprende adicionalmente una o más proteínas adicionales.

- 30 En una realización, la VLP comprende adicionalmente una proteína de matriz (M). En una realización, la proteína M se obtiene de una cepa humana del RSV. En otra realización, la proteína M se obtiene de una cepa bovina del RSV. En otras realizaciones, la proteína de matriz puede ser una proteína M1 de una cepa del virus de la gripe. En una realización, la cepa del virus de la gripe es una cepa del virus de la gripe aviar. En otras realizaciones, la proteína M puede obtenerse de una cepa del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

- 35 En realizaciones adicionales, la VLP comprende adicionalmente la glucoproteína G del RSV. En otras realizaciones, la VLP comprende adicionalmente la glucoproteína SH del RSV. En otra realización más, la VLP comprende adicionalmente la proteína de nucleocápsida N del RSV.

Las proteínas F modificadas o mutadas del RSV pueden usarse para la prevención y/o tratamiento de infección por RSV. Por tanto, en otro aspecto, se proporciona en este documento un método para provocar una respuesta inmunitaria contra RSV. El método implica administrar a un sujeto, tal como a un sujeto humano o a un animal, una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que contiene la proteína F modificada o mutada del RSV.

- 40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones de vacuna farmacéuticamente aceptables que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención.

- 45 En una realización, la invención comprende una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En otra realización, la divulgación comprende una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En aún otra realización, la divulgación comprende una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención.

- 50 En otra realización la divulgación proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las formulaciones de vacuna de la invención.

- 55 Se proporciona un método de formulación de una vacuna o composición antigénica que induce inmunidad contra una infección o al menos un síntoma de enfermedad de la misma a un mamífero, que comprende añadir a la formulación una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. En un

ejemplo preferido, la infección es una infección por RSV.

Las proteínas F modificadas o mutadas del RSV de la invención son útiles para preparar composiciones que estimulan una respuesta inmunitaria que confiere inmunidad o inmunidad sustancial contra agentes infecciosos. Por tanto, se proporciona un método para inducir inmunidad a infecciones o al menos un síntoma de enfermedad de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

Se proporciona en este documento un método para inducir una inmunidad sustancial a la infección por el virus del VRS o al menos un síntoma de la enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del VRS, una micela F del VRS que comprende una proteína F modificada o mutada del VRS, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

Las composiciones de la divulgación pueden inducir inmunidad sustancial en un vertebrado (por ejemplo, un humano) cuando se administra al vertebrado. Por lo tanto, se proporciona en este documento un método para inducir una inmunidad sustancial a la infección por el virus del VRS o al menos un síntoma de la enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del VRS, una micela F del VRS que comprende una proteína F modificada o mutada del VRS, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. En otro ejemplo, se proporciona en este documento un método para vacunar a un mamífero contra el VSR que comprende administrar al mamífero una cantidad inductora de protección de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

Se proporciona en este documento un método para inducir una respuesta de anticuerpos protectores a una infección o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

En el presente documento se proporciona un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del RSV. En el presente documento se proporciona un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. En el presente documento se proporciona un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una VLP, en donde la VLP comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

En otro aspecto más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV la cual se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto más, la invención proporciona una célula aislada que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En un ejemplo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En un ejemplo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 9. En una realización, el vector es un vector de baculovirus.

Se proporciona en este documento un método de preparación de una proteína F del RSV, que comprende (a) transformar una célula hospedadora para que exprese un ácido nucleico que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención; y (b) cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que conducen a la producción de dicha proteína F del RSV. En un ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína F modificada o mutada del RSV se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 9.

En otro ejemplo, la célula hospedadora es una célula de insecto. En un ejemplo adicional, la célula hospedadora es una célula de insecto transfectada con un vector de baculovirus que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención.

Se proporciona aquí un método de preparación de una micela de proteína F del RSV, que comprende (a) transformar una célula hospedadora para que exprese un ácido nucleico que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención; y (b) cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que conducen a la producción de dicha micela proteína F del RSV. En un ejemplo, el ácido nucleico que codifica una proteína F modificada o mutada del RSV se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 9.

En un ejemplo, la célula hospedadora es una célula de insecto. En un ejemplo, la célula hospedadora es una célula de insecto transfectada con un vector de baculovirus que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 representa la estructura de la proteína F₀ de tipo silvestre de HRSV.

La Figura 2 representa estructuras de proteínas F₀ modificadas del RSV con mutaciones en el sitio de escisión como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 3 representa sustituciones conservativas (R133Q, R135Q y R136Q) en el sitio de escisión principal de la proteína F modificada BV n.º 541 de HRSV (SEQ ID NO: 6).
- 10 La Figura 4 representa la secuencia y estructura de la proteína F modificada BV n.º 541 de HRSV (SEQ ID NO: 6).

La Figura 5 representa la secuencia y estructura de la proteína F modificada BV n.º 622 de HRSV (SEQ ID NO: 10).

La Figura 6 representa gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE de la proteína F recombinante purificada BV n.º 622 de HRSV con o sin la presencia de β ME.

La Figura 7 representa la estructura de la proteína F modificada BV n.º 683 de HRSV (SEQ ID NO: 8).
- 15 La Figura 8 representa geles teñidos con Coomassie de SDS-PAGE de proteínas F recombinantes purificadas BV n.º 622 y BV n.º 683 de HRSV con o sin la presencia de β ME (en la izquierda), y sus estructuras.

La Figura 9 representa un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE (en la izquierda) y análisis de transferencia de Western (en la derecha) de la proteína F recombinante BV n.º 683 de HRSV con o sin la presencia de β ME.
- 20 La Figura 10 representa un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE usado en análisis de pureza por densitometría de exploración (en la izquierda) y transferencia de Western (en la derecha) de la proteína F recombinante purificada BV n.º 683 de HRSV.

La Figura 11 representa imágenes de micelas (rosetas) de la proteína F recombinante purificada BV n.º 683 de HRSV tomadas en microscopía electrónica con tinción negativa.

La Figura 12 representa el análisis de tamaño de partículas de micelas de proteína F BV n.º 683 de HRSV.
- 25 La Figura 13 representa un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE (en la izquierda) y análisis de transferencia de Western (en la derecha) de proteínas F modificadas BV n.º 622 y BV n.º 623 (SEQ ID NO: 21) de HRSV con o sin co-expresión con las proteínas N de HRSV y M de BRSV en las recolecciones de cultivo celular en bruto (intracelulares) o muestras sedimentadas por separación en gradiente de sacarosa al 30 %, y las estructuras de BV n.º 622 y BV n.º 623.
- 30 La Figura 14 representa un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE (en la izquierda) y análisis de transferencia de Western (en la derecha) de la proteína F modificada BV n.º 622 de HRSV, BV n.º 636 quimérica en tándem doble (BV n.º 541 + BRSV M), BV n.º 683, BV n.º 684 (BV n.º 541 con el dominio L de YIAL), y BV n.º 685 (BV n.º 541 con el dominio L de YKKL) con o sin co-expresión con las proteínas N de HRSV y M de BRSV en las muestras de recolección de cultivo celular en bruto (intracelulares), y la estructura de cada proteína F modificada de HRSV analizada.
- 35 La Figura 15 representa un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE (en la izquierda) y análisis de transferencia de Western (en la derecha) de la proteína F modificada BV n.º 622 del RSV (SEQ ID NO: 10), BV n.º 636 quimérica en tándem doble (BV n.º 541 + M de BRSV), BV n.º 683 (SEQ ID NO: 8), BV n.º 684 (BV n.º 541 con el dominio L de YIAL), y BV n.º 685 (BV n.º 541 con el dominio L de YKKL) con o sin co-expresión con las proteínas N de HRSV y M de BRSV en las muestras sedimentadas por separación en gradiente de sacarosa al 30 %, y la estructura de cada proteína F modificada de HRSV analizada.
- 40 La Figura 16 representa la estructura, nombre del clon, descripción, resultados de transferencia de Western y SDS-PAGE con Coomassie, y la conclusión de cada proteína F modificada del RSV como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 17 representa los procedimientos experimentales del estudio de exposición a RSV como se describe en el Ejemplo 10.
- 45 La Figura 18 representa los resultados del ensayo de neutralización del RSV en el día 39 y en el día 46 de ratones inmunizados con PBS, RSV vivo, FI-RSV, 1 ug de PFP, 1 ug de PFP + Alumbre, 10 ug de PFP, 10 ug de PFP + Alumbre, 30 ug de PFP, y control positivo (anticuerpo de oveja anti-F).

La Figura 19 representa los títulos del RSV en tejidos pulmonares de ratones inmunizados con PBS, RSV vivo, FI-RSV, 1 ug de PFP, 1 ug de PFP + Alumbre, 10 ug de PFP, 10 ug de PFP + Alumbre, y 30 ug de PFP, 4 días después

de la exposición del RSV infeccioso.

La Figura 20 representa un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie de proteína F recombinante purificada BV n.º 683 del RSV almacenada a 2 - 8 °C durante 0, 1, 2, 4, y 5 semanas.

5 La Figura 21 representa las respuestas de anticuerpo neutralizante del RSV y del RSVB después de inmunización con RSV vivo (RSV), RSV inactivado con formalina (FI-RSV), proteína F BV n.º 683 del RSV con o sin aluminio (PFP y PFP + adyuvante de aluminio), y controles de PBS.

La Figura 22 representa la patología pulmonar después de exposición con RSV en ratas inmunizadas con RSV vivo, RSV inactivado con formalina (FI-RSV), proteína F BV n.º 683 del RSV con o sin aluminio (micela F (30 ug) y micela F (30ug) + adyuvante de aluminio), y controles de PBS.

10 Descripción detallada

Definiciones

15 Como se usa en este documento, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se usa en combinación con un inmunógeno específico (por ejemplo, una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV) en una formulación, aumentará o alterará de otro modo o modificará la respuesta inmunitaria resultante. La modificación de la respuesta inmunitaria incluye, intensificación o ampliación de la especificidad de cualquiera de o ambas de las respuestas inmunitarias de anticuerpo y celulares. La modificación de la respuesta inmunitaria también puede significar disminuir o suprimir ciertas respuestas inmunitarias específicas de antígeno.

20 Como se usa en este documento, la expresión "formulación antigénica" o "composición antigénica" se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, especialmente un ave o un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria.

25 Como se usa en este documento, la expresión "virus de la gripe aviar" se refiere a virus de la gripe encontrados principalmente en aves pero que también pueden infectar a seres humanos u otros animales. En algunos casos, los virus de la gripe aviar pueden transmitirse o propagarse de un ser humano a otro. Un virus de la gripe aviar que infecta a seres humanos tiene el potencial de causar una gripe pandémica, es decir, morbilidad y/o mortalidad en seres humanos. Una pandemia sucede cuando una nueva cepa de virus de la gripe (un virus en que el ser humano no tiene inmunidad natural) surge, propagándose más allá de las localidades individuales, posiblemente alrededor del mundo, e infectando a muchos seres humanos a la vez.

30 Como se usa en este documento, una "dosis eficaz", en líneas generales, se refiere a esa cantidad de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención suficiente para inducir inmunidad, para prevenir y/o mejorar una infección o para reducir al menos un síntoma de una infección o enfermedad, y/o para potenciar la eficacia de otra dosis de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. Una dosis eficaz puede referirse a la cantidad de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV suficiente para retardar o minimizar la aparición de una infección o enfermedad. Una dosis eficaz también puede referirse a la cantidad de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una infección o enfermedad. Adicionalmente, una dosis eficaz es la cantidad con respecto a una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención en solitario, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una infección o enfermedad. Una dosis eficaz también puede ser la cantidad suficiente para potenciar la propia respuesta inmunitaria del sujeto (por ejemplo, de un ser humano) contra una posterior exposición a un agente infeccioso o enfermedad. Los niveles de inmunidad pueden controlarse, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos neutralizantes de secreción y/o en suero, por ejemplo, por neutralización de placas, fijación del complemento, en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, o microneutralización, o midiendo las respuestas celulares, tales como, aunque sin limitación, células T citotóxicas, células presentadoras de antígeno, células T auxiliares, células dendríticas y/u otras respuestas celulares. Las respuestas de células T pueden controlarse, por ejemplo, midiendo, por ejemplo, la cantidad de células CD4⁺ y CD8⁺ presentes usando marcadores específicos por citometría de flujo fluorescente o ensayos de células T, tales como, aunque sin limitación, ensayo de proliferación de células T, ensayos citotóxicos de células T, ensayo TETRAMER, y/o ensayo ELISPOT. En el caso de una vacuna, una "dosis eficaz" es una que previene la enfermedad y/o reduce la gravedad de los síntomas.

55

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína F modificada

- o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV necesaria o suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Una cantidad eficaz de la composición sería la cantidad que consigue un resultado seleccionado, y dicha cantidad podría determinarse como una cuestión de experimentación rutinaria por un experto en la materia. Por ejemplo, una cantidad eficaz para prevenir, tratar y/o mejorar una infección podría ser esa cantidad necesaria para causar la activación del sistema inmunitario, provocando el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica de antígeno tras la exposición a una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. La expresión también es sinónima de "cantidad suficiente".
- 10 Como se usa en este documento, el término "expresión" se refiere al proceso por el cual los poli(ácidos nucleicos) se transcriben en ARNm y se traducen en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el poli(ácido nucleico) se obtiene de ADN genómico, la expresión puede incluir, si se selecciona una célula u organismo hospedador eucariota apropiado, corte y empalme del ARNm. En el contexto de la presente invención, el término también abarca la producción de ARNm del gen de F RSV y proteínas F del RSV obtenidas después de la expresión del mismo.
- 15 Como se usa en este documento, la expresión "proteína F" o "proteína de fusión" o "polipéptido de la proteína F" o "polipéptido de la proteína de fusión" se refiere a un polipéptido o proteína que tiene todo o parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la proteína de fusión del RSV. Asimismo, la expresión "proteína G" o "polipéptido de la proteína G" se refiere a un polipéptido o proteína que tiene todo o parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la proteína de unión del RSV. Se han descrito numerosas proteínas de fusión y unión del RSV y son conocidas para los expertos en la materia. El documento WO/2008/114149, establece variantes de ejemplo de la proteína F y G (por ejemplo, variantes de origen natural).
- 20 Como se usa en este documento, los términos "inmunógenos" o "antígenos" se refieren a sustancias tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria. Ambos términos también abarcan epítomos, y se usan de forma intercambiable.
- 25 Como se usa en este documento, el término "inmunoestimulador" se refiere a un compuesto que potencia una respuesta inmunitaria mediante los propios mensajeros químicos del organismo (citoquinas). Estas moléculas comprenden diversas citoquinas, linfoquinas y quimioquinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras, y proinflamatorias, tales como interferones (IFN- γ), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores del crecimiento (por ejemplo, factor estimulador de colonias (CSF) de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que las VLP de la invención, o pueden administrarse por separado. La proteína o un vector de expresión que codifica la proteína pueden administrarse para producir un efecto inmunoestimulador.
- 30 Como se usa en este documento, la expresión "formulación inmunogénica" se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria.
- 35 Como se usa en este documento, la expresión "agente infeccioso" se refiere a microorganismos que causan una infección en un vertebrado. Habitualmente, los organismos son virus, bacterias, parásitos, protozoos y/u hongos.
- 40 Como se usa en este documento, los términos "mutado", "modificado", "mutación", o "modificación" indican cualquier modificación de un ácido nucleico y/o polipéptido que produzca un ácido nucleico o polipéptido alterado. Las mutaciones incluyen, por ejemplo, mutaciones puntuales, deleciones o inserciones de un único resto o múltiples restos en un polinucleótido, que incluye alteraciones que surgen dentro de una región codificante de la proteína de un gen, así como alteraciones en regiones fuera de una secuencia codificante de la proteína, tales como, aunque sin limitación, secuencias reguladoras o promotoras. Una alteración genética puede ser una mutación de cualquier tipo. Por ejemplo, la mutación puede constituir una mutación puntual, una mutación de desplazamiento de fase, una inserción, o una deleción de parte o todo un gen. En algunas realizaciones, las mutaciones son de origen natural. En otras realizaciones, las mutaciones son los resultados de presión artificial de mutación. En otras realizaciones más, las mutaciones en las proteínas F del RSV son el resultado de ingeniería genética.
- 45 Como se usa en este documento, el término "multivalente" se refiere a composiciones que tienen una o más proteínas/péptidos antigénicos o inmunógenos contra múltiples tipos o cepas de agentes infecciosos o enfermedades.
- 50 Como se usa en este documento, la expresión "vacuna farmacéuticamente aceptable" se refiere a una formulación que contiene una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la presente invención, que está en una forma que se puede administrar a un vertebrado y que induce una respuesta inmunitaria protectora suficiente para inducir inmunidad para prevenir y/o mejorar una infección o enfermedad, y/o para reducir al menos un síntoma de una infección o enfermedad, y/o para potenciar la eficacia de otra dosis de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. Normalmente, la vacuna comprende un medio convencional de solución salina o de solución acuosa tamponada en que la composición de la presente invención se
- 55

suspende o disuelve. En esta forma, la composición de la presente invención puede usarse de forma conveniente para prevenir, mejorar, o tratar de otro modo una infección. Tras la introducción en un hospedador, la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmunitaria que incluye, aunque sin limitación, la producción de anticuerpos y/o citoquinas y/o la activación de células T citotóxicas, células presentadoras de antígeno, células T auxiliares, células dendríticas y/u otras respuestas celulares.

Como se usa en este documento, la expresión "respuesta inmunitaria protectora" o "respuesta protectora" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos contra un agente infeccioso o enfermedad, que se muestra por un vertebrado (por ejemplo, un ser humano) que previene o mejora una infección o reduce al menos un síntoma de enfermedad de la misma. Las proteínas F modificadas o mutadas del RSV, micelas F del RSV que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV, o VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención pueden estimular la producción de anticuerpos que, por ejemplo, neutralicen agentes infecciosos, bloquean la entrada de agentes infecciosos en las células, bloquean la replicación de los agentes infecciosos, y/o protegen las células hospedadoras de infección y destrucción. La expresión también puede referirse a una respuesta inmunitaria que está mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos contra un agente infeccioso o enfermedad, mostrada por un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora la infección o enfermedad, o reduce al menos un síntoma de la misma.

Como se usa en este documento, el término "vertebrado" o "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier miembro del subfilo *Cordata*, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos. Los animales de granja tales como ganado bovino, ovejas, cerdos, cabras y caballos; los mamíferos domésticos tales como perros y gatos; los animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas (incluyendo ratas del algodón) y cobayas; las aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza tales como gallinas, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares también son ejemplos no limitantes. Los términos "mamíferos" y "animales" se incluyen en esta definición. Se pretende que estén cubiertos tantos individuos adultos como recién nacidos. En particular, los bebés y niños pequeños son sujetos o pacientes apropiados para una vacuna contra RSV.

Como se usa en este documento, la expresión "partícula de tipo virus" (VLP, *virus-like particle*) se refiere a una estructura que en al menos un atributo se parece a un virus pero que no se ha demostrado que sea infecciosa. Las partículas de tipo virus no transportan información genética que codifique las proteínas de las partículas de tipo virus. En general, las partículas de tipo virus carecen de un genoma vírico y, por lo tanto, son no infecciosas. Además, las partículas de tipo virus a menudo pueden producirse en grandes cantidades por expresión heteróloga y pueden purificarse fácilmente.

Como se usa en este documento, la expresión "VLP quimérica" se refiere a VLP que contienen proteínas, o partes de las mismas, a partir de al menos dos agentes infecciosos diferentes (proteínas heterólogas). Habitualmente, una de las proteínas se obtiene de un virus que puede dirigir la formación de las VLP a partir de células hospedadoras. Ejemplos, con fines ilustrativos, son la proteína M del BRSV y/o las proteínas G o F del HRSV. Las expresiones VLP del RSV y VLP quiméricas pueden usarse de forma intercambiable cuando sea apropiado.

Como se usa en este documento, el término "vacuna" se refiere a una preparación de patógenos destruidos o debilitados, o de determinantes antigénicos derivados, que se usa para inducir la formación de anticuerpos o inmunidad contra el patógeno. Una vacuna se administra para proporcionar inmunidad contra la enfermedad, por ejemplo, gripe, que está causada por virus de la gripe. Además, el término "vacuna" también se refiere a una suspensión o solución de un inmunógeno (por ejemplo, una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV) que se administra a un vertebrado para producir inmunidad protectora, es decir, inmunidad que previene o reduce la gravedad de la enfermedad asociada con la infección. La presente invención proporciona composiciones de vacuna que son inmunogénicas y pueden proporcionar protección contra una enfermedad asociada con la infección.

Proteínas F del RSV

Se expresan dos proteínas estructurales de membrana, las proteínas F y G, sobre la superficie del RSV, y han demostrado ser dianas de anticuerpos neutralizantes (Sullender, W., 2000, *Clinical Microbiology Review* 13, 1-15). Estas dos proteínas son también principalmente responsables del reconocimiento vírico y la entrada en células diana; la proteína G se une a un receptor celular específico y la proteína F promueve la fusión del virus con la célula. La proteína F también se expresa sobre la superficie de células infectadas y es responsable de la posterior fusión con otras células que conduce a formación de sincitios. Por tanto, anticuerpos contra la proteína F pueden neutralizar el virus o bloquear la entrada del virus en la célula o prevenir la formación de sincitios. Aunque se han descrito diferencias antigénicas y estructurales entre los subtipos A y B para ambas proteínas G y F, las diferencias antigénicas más significativas residen en la proteína G, donde las secuencias de aminoácidos son solamente un 53 % homólogas y la relación antigénica es del 5 % (Walsh et al. (1987) *J. Infect. Dis.* 155, 1198-1204; y Johnson et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,5625-5629). A la inversa, anticuerpos creados contra la proteína F muestran un alto grado de reactividad cruzada entre virus del subtipo A y B.

La proteína F del RSV dirige la penetración del RSV por fusión entre la proteína de envuelta del virión y la membrana

plasmática de la célula hospedadora. Posteriormente a la infección, la proteína F expresada sobre la superficie celular puede mediar la fusión con células vecinas para formar sincitios. La proteína F es una proteína superficial transmembrana de tipo I que tiene un péptido señal escindido N-terminal y un anclaje de membrana cerca del extremo C-terminal. La proteína F del RSV se sintetiza como un precursor F₀ inactivo que se ensambla en un homotrímero y se activa por escisión en el complejo trans-Golgi por una endoproteasa celular para producir dos subunidades unidas por disulfuro, las subunidades F₁ y F₂. El extremo N-terminal de la subunidad F₁ que se crea por escisión contiene un dominio hidrófobo (el péptido de fusión) que se inserta directamente en la membrana diana para iniciar la fusión. La subunidad F₁ también contiene repeticiones de siete unidades que se asocian durante la fusión, dirigiendo un desplazamiento conformacional que pone las membranas vírica y celular en cercana proximidad (Collins y Crowe, 2007, Fields Virology, 5ª ed., D.M Kipe et al., Lipincott, Williams and Wilkons, pág. 1604). La SEQ ID NO: 2 (N.º de acceso a GenBank AAB59858) representa una proteína F RSV representativa, que está codificada por el gen mostrado en la SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso a GenBankM11486).

En la naturaleza, la proteína F del RSV se expresa como un único precursor polipeptídico, de 574 aminoácidos de longitud, denominado FO. *In vivo*, FO se oligomeriza en el retículo endoplasmático y se procesa proteolíticamente por una furina proteasa en dos secuencias consenso de furina conservadas (sitios de escisión de furina), RARR (SEQ ID NO: 23) (secundaria) y KKRKRR (SEQ ID NO: 24) (primaria) para generar un oligómero que consiste en dos fragmentos unidos por disulfuro. El más pequeño de estos fragmentos se llama F₂ y se origina a partir de la parte N-terminal del precursor FO. Se reconocerá por los expertos en la materia que las abreviaturas FO, F₁ y F₂ se denominan habitualmente F₀, F₁ y F₂ en la bibliografía científica. El más grande, el fragmento F₁ C-terminal ancla la proteína F en la membrana mediante una secuencia de aminoácidos hidrófobos, que están adyacentes a una cola citoplasmática de 24 aminoácidos. Tres dímeros F₂-F₁ se asocian para formar una proteína F madura, que adopta una conformación prefusogénica ("prefusión") metaestable que se activa para experimentar un cambio conformacional tras contacto con una membrana celular diana. Este cambio conformacional expone una secuencia hidrófoba, conocida como el péptido de fusión, que se asocia con la membrana de la célula hospedadora y promueve la fusión de la membrana del virus, o una célula infectada, con la membrana celular diana.

El fragmento F₁ contiene al menos dos dominios de repetición de siete unidades, denominados HRA y HRB, y se sitúa en proximidad al péptido de fusión y los dominios de anclaje transmembrana, respectivamente. En la conformación prefusión, el dímero F₂-F₁ forma una estructura de cabeza globular y tallo, en que los dominios HRA están en una conformación segmentada (ampliada) en la cabeza globular. En contraste, los dominios HRB forman un tallo súper-enrollado de tres hebras que se extiende desde la región de cabeza. Durante la transición de las conformaciones prefusión a postfusión, los dominios HRA colapsan y se ponen en proximidad a los dominios HRB para formar un haz de seis hélices anti-paralelo. En el estado postfusión, el péptido de fusión y los dominios transmembrana se yuxtaponen para facilitar la fusión de membrana.

Aunque la descripción conformacional proporcionada anteriormente se basa en el modelado molecular de datos cristalográficos, las distinciones estructurales entre las conformaciones prefusión y postfusión pueden controlarse sin recurrir a cristalografía. Por ejemplo, puede usarse micrografía electrónica para distinguir entre las conformaciones prefusión y postfusión (denominadas alternativamente prefusogénica y fusogénica, como se demuestra por Calder et al., Virology, 271:122-131 (2000) y Morton et al., Virology, 311: 275-288.

La conformación prefusión también puede distinguirse de la conformación fusogénica (postfusión) por ensayos de asociación de liposomas como se describe por Connolly et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:17903-17908 (2006).

Adicionalmente, las conformaciones prefusión y fusogénica pueden distinguirse usando anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que reconocen específicamente epítopos conformacionales presentes en una con la otra forma prefusión o fusogénica de la proteína F del RSV, pero no en la otra forma. Dichos epítopos conformacionales pueden deberse a exposición preferente de un determinante antigénico sobre la superficie de la molécula. Como alternativa, pueden surgir epítopos conformacionales de la yuxtaposición de aminoácidos que no están contiguos en el polipéptido lineal.

Proteínas F modificadas o mutadas del RSV

Los presentes inventores han descubierto que, pueden conseguirse niveles sorprendentemente altos de expresión de la proteína de fusión (F) cuando se hacen modificaciones específicas a la estructura de la proteína F del RSV. Dichas modificaciones también reducen inesperadamente la toxicidad celular de la proteína F del RSV en una célula hospedadora. Además, las proteínas F modificadas de la presente invención muestran una capacidad mejorada de mostrar la morfología de "piruleta" postfusión en oposición a la homología de "varilla" prefusión. Por tanto, en un aspecto, las proteínas F modificadas de la presente invención también pueden mostrar inmunogenicidad mejorada (por ejemplo, potenciada) en comparación con proteínas F de tipo silvestre (por ejemplo, ejemplificadas por la SEQ ID NO: 2, que corresponde con el n.º de acceso a GenBank AAB59858). Estas modificaciones tienen aplicaciones significativas para el desarrollo de vacunas y métodos de uso de dichas vacunas para el tratamiento y/o prevención del RSV.

De acuerdo con la presente divulgación, se puede hacer cualquier número de mutaciones en proteínas F de RSV

nativas o de tipo silvestre, y en un aspecto preferido, se pueden hacer mutaciones múltiples para dar como resultado una expresión mejorada y/o propiedades inmunogénicas en comparación con las proteína F del RSV nativas o de tipo silvestre. Tales mutaciones incluyen mutaciones puntuales, mutaciones de desplazamiento de marco, deleciones e inserciones, prefiriéndose una o más (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro, etc.) mutaciones.

- 5 El polipéptido de proteína F nativo se puede seleccionar de cualquier proteína F de una cepa A del RSV, cepa B del RSV, cepa A del HRSV, cepa B del HRSV, cepa del BRSV o cepa aviar del RSV, o de sus variantes (como se definió anteriormente). En ciertas realizaciones de ejemplo, el polipéptido de proteína F nativo es la proteína F representada por la SEQ ID NO: 2 (N° de acceso a GenBank AAB59858). Para facilitar la comprensión de esta descripción, todas las posiciones de restos de aminoácido, independientemente de la cepa, se dan con respecto a (es decir, la posición del resto de aminoácido corresponde a) la posición de aminoácido de la proteína F de ejemplo.

10 Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente posiciones comparables de aminoácido de la proteína F a partir de otras cepas del RSV alineando las secuencias de aminoácidos de la cepa seleccionada del RSV con la de la secuencia de ejemplo usando algoritmos fácilmente disponibles y bien conocidos de alineación (tales como BLAST, por ejemplo, usando parámetros por defecto). Se describen numerosos ejemplos adicionales de polipéptidos de proteína F a partir de diferentes cepas del RSV en el documento WO/2008/114149.

Pueden surgir variantes adicionales a través de la deriva genética, o pueden producirse de forma artificial usando mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o por recombinación de dos o más variantes preexistentes. Tales variantes adicionales también son adecuadas en el contexto de las proteínas F del RSV modificadas o mutadas divulgadas en este documento.

- 20 Pueden introducirse mutaciones en las proteínas F del RSV de la presente invención usando cualquier metodología conocida para los expertos en la materia. Pueden introducirse mutaciones aleatoriamente, por ejemplo, realizando una reacción de PCR en presencia de manganeso como cofactor de ion metálico divalente. Como alternativa, puede usarse mutagénesis dirigida por oligonucleótido para crear las proteínas F mutantes o modificadas del RSV, que permite todas las posibles clases de cambios de pares de bases en cualquier sitio determinado a lo largo de la molécula de ADN codificante. En general, esta técnica implica hibridar un oligonucleótido complementario (excepto por uno o más desapareamientos) con una secuencia monocatenaria de nucleótidos que codifica la proteína F del RSV de interés. El oligonucleótido desapareado después se amplía por ADN polimerasa, generando una molécula de ADN bicatenaria que contiene el cambio deseado en la secuencia en una hebra. Los cambios en secuencia pueden provocar, por ejemplo, la deleción, sustitución, o inserción de un aminoácido. El polinucleótido bicatenario después puede insertarse en un vector de expresión apropiado, y por tanto puede producirse un polipéptido mutante o modificado. La mutagénesis dirigida por oligonucleótido descrita anteriormente puede realizarse, por ejemplo, mediante PCR.

Proteínas adicionales del RSV

- 35 La divulgación también abarca partículas de tipo virus (VLP) del RSV que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención que puede formularse en vacunas o formulaciones antigénicas para proteger a vertebrados (por ejemplo, seres humanos) contra infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad de la misma. En algunas realizaciones, la VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención comprende adicionalmente proteínas adicionales del RSV, tales como M, N, G, y SH. En otras realizaciones, la VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención comprende adicionalmente proteínas de cepas heterólogas de virus, tales como las proteínas HA, NA, y M1 del virus de la gripe. En una realización, la proteína M1 del virus de la gripe se obtiene de una cepa del virus de la gripe aviar.

- 45 La proteína N del RSV se une estrechamente tanto a ARN genómico como al ARN antígenómico intermedio replicativo para formar nucleocápsida resistente a RNasa. Las SEQ ID NO: 16 (de tipo silvestre) y 18 (de codones optimizados) representan secuencias de aminoácidos representativas de la proteína N del RSV y las SEQ ID NO: 15 (de tipo silvestre) y 17 (de codones optimizados) representan secuencias de ácidos nucleicos representativas que codifican la proteína N del RSV. Se abarcan en esta invención proteínas N del RSV que son al menos aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, idénticas a la SEQ ID NO: 18, y todos los fragmentos y variantes (incluyendo proteínas químicas) de las mismas.

- 55 La proteína M del RSV es una proteína de virión interna no glucosilada que se acumula en la membrana plasmática que interacciona con la proteína F del RSV y otros factores durante la morfogénesis del virus. En ciertas realizaciones preferidas, la proteína M del RSV es una proteína M del RSV bovino (BRSV). Las SEQ ID NO: 12 (de tipo silvestre) y 14 (de codones optimizados) representan secuencias de aminoácidos representativas de la proteína M de BRSV y las SEQ ID NO: 11 (de tipo silvestre) y 13 (de codones optimizados) representan secuencias de ácidos nucleicos representativas que codifican la proteína M de BRSV. Se abarcan en esta divulgación proteínas M del RSV (incluyendo, aunque sin limitación BRSV) que son al menos aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, o

aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, idénticas a las SEQ ID NO: 12 y 14, y todos los fragmentos y variantes (incluyendo proteínas quiméricas) de las mismas.

La proteína G del RSV es una glucoproteína transmembrana de tipo II con una única región hidrófoba cerca del extremo N-terminal que sirve tanto como péptido señal no escindido y como anclaje de membrana, que conduce a dos tercios C-terminales de la molécula orientados de forma externa. La proteína G del RSV también se expresa como proteína secretada que surge del inicio de la traducción en el segundo AUG en la ORF (en aproximadamente el aminoácido 48), que recae dentro de la señal/anclaje. La mayor parte del ectodominio de la proteína G del RSV es muy divergente entre cepas I RSV (*Id.*, pág. 1607). La SEQ ID NO: 26 representa una proteína G del RSV representativa, que está codificada por la secuencia génica mostrada en la SEQ ID NO: 25. Se abarcan en esta divulgación proteínas G del RSV que son al menos aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, idénticas a la SEQ ID NO: 26, y todos los fragmentos y variantes (incluyendo proteínas quiméricas) de las mismas.

La proteína SH del RSV es una proteína transmembrana de tipo II que contiene 64 (subgrupo A del RSV) o 65 restos de aminoácido (subgrupo B del RSV). Algunos estudios han sugerido que la proteína SH del RSV puede tener un papel en la fusión vírica o en el cambio de la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, los RSV que carecen del gen SH son viables, causan formación de sincitios y crecen igual de bien que el virus de tipo silvestre, lo que indica que la proteína SH no es necesaria para que el virus entre en las células hospedadoras o para la formación de sincitios. La proteína SH del RSV ha demostrado la capacidad de inhibir la señalización de TNF- α . La SEQ ID NO: 27 representa una secuencia de aminoácidos representativa de la proteína SH del RSV. Se abarcan en esta divulgación proteínas SH del RSV que son al menos aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 %, idénticas a la SEQ ID NO: 27, y todos los fragmentos y variantes (incluyendo proteínas quiméricas) de las mismas.

Vacunas contra RSV

Actualmente, el único enfoque apropiado para la profilaxis de enfermedad por RSV es inmunización pasiva. Se obtuvieron evidencias iniciales que sugieren un papel protector para IgG a partir de observaciones que implican anticuerpos maternos en hurones (Prince, G.A., Ph.D. diss., University of California, Los Angeles, 1975) y seres humanos (Lambrecht *et al.*, (1976) J. Infect. Dis. 134,211-217; y Glezen *et al.* (1981) J. Pediatr. 98,708-715). Hemming *et al.* (Morell *et al.*, eds., 1986, Clinical Use of Intravenous Immunoglobulins, Academic Press, London en las páginas 285-294) reconocieron la posible utilidad de anticuerpos contra RSV en el tratamiento o prevención de infección por RSV durante estudios que implicaban la farmacocinética de una inmunoglobulina intravenosa (IVIG) en recién nacidos sospechosos de tener sepsis neonatal. Apreciaron que un bebé, cuyas secreciones respiratorias producían RSV, se recuperaba rápidamente después de infusión con IVIG. El análisis posterior del lote de IVIG reveló un título inusualmente alto de anticuerpo neutralizante del RSV. Este mismo grupo de investigadores después examinó la capacidad de suero hiperinmune o inmunoglobulina, enriquecida para anticuerpo neutralizante del RSV, de proteger ratas del algodón y primates contra infección por RSV (Prince *et al.* (1985) Virus Res. 3, 193-206; Prince *et al.* (1990) J. Virol. 64, 3091-3092). Los resultados de estos estudios sugirieron que anticuerpos neutralizantes del RSV dados de forma profiláctica inhibían la replicación en el tracto respiratorio del RSV en ratas del algodón. Cuando se administran terapéuticamente, los anticuerpos contra RSV reducían la replicación vírica pulmonar tanto en ratas del algodón como en un modelo de primate no humano. Además, la infusión pasiva de suero inmune o inmunoglobulina no producía patología pulmonar potenciada en ratas del algodón posteriormente expuestas con RSV.

Como la infección por RSV puede prevenirse proporcionando anticuerpos neutralizantes a un vertebrado, una vacuna que comprenda una proteína F modificada o mutada del RSV puede inducir, cuando se administra a un vertebrado, anticuerpos neutralizantes *in vivo*. Las proteínas F modificadas o mutadas del RSV se usan favorablemente para la prevención y/o tratamiento de infección por RSV. Por tanto, otro aspecto de esta divulgación se refiere a un método para provocar una respuesta inmunitaria contra el RSV. El método implica administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que contiene una proteína F modificada o mutada del RSV a un sujeto (tal como un sujeto humano o animal). La administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición provoca una respuesta inmunitaria específica para epítopos presentes en la proteína F modificada o mutada del RSV. Dicha respuesta inmunitaria puede incluir respuestas de células B (por ejemplo, la producción de anticuerpos neutralizantes) y/o respuestas de células T (por ejemplo, la producción de citoquinas). Preferiblemente, la respuesta inmunitaria provocada por la proteína F modificada o mutada del RSV incluye elementos que son específicos para al menos un epítipo conformacional presente en la proteína F modificada o mutada del RSV. En una realización, la respuesta inmunitaria se especifica para un epítipo presente en una proteína F del RSV encontrada en el estado activo postfusión de "piruleta". Las proteínas F del RSV y composiciones pueden administrarse a un sujeto sin potenciar la enfermedad vírica después del contacto con el RSV. Preferiblemente, las proteínas F modificadas o mutadas del RSV descritas en este documento y composiciones inmunogénicas formuladas adecuadamente provocan una respuesta inmunitaria desviada a Th1 que reduce o previene la infección con un RSV y/o reduce o previene una

respuesta patológica después de infección con un RSV.

En una realización, las proteínas F del RSV de la presente invención se encuentran en forma de micelas (por ejemplo, rosetas). Las micelas que se pueden obtener de acuerdo con la divulgación consisten en agregados de las proteínas en espiga F, inmunológicamente activas, que tienen una estructura de tipo roseta. Las rosetas son visibles con el microscopio electrónico (Calder *et al.*, 2000, *Virology* 271: 122-131). Preferiblemente, las micelas de la presente divulgación, que comprenden proteínas F modificadas o mutadas del RSV, muestran la morfología de "piruleta" indicativa del estado activo postfusión. En una realización, las micelas se purifican después de la expresión en una célula hospedadora. Cuando se administran a un sujeto, las micelas inducen preferiblemente anticuerpos neutralizantes. En algunas realizaciones, las micelas pueden ser para administración con un adyuvante. En otras realizaciones, las micelas pueden ser para administración sin un adyuvante.

En otra realización, la divulgación abarca partículas de tipo virus (VLP) del RSV que comprenden una proteína F modifica o mutada del RSV de la invención que puede formularse en vacunas o formulaciones antigénicas para proteger a los vertebrados (por ejemplo, seres humanos) contra infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad de la misma. La presente divulgación también se refiere a VLP del RSV y vectores que comprenden genes de tipo silvestre y mutados del RSV o una combinación de los mismos derivados de diferentes cepas de virus RSV, que cuando se transfectan en células hospedadoras, producirán partículas de tipo virus (VLP) que comprenden proteínas del RSV.

En algunas realizaciones, las partículas de tipo virus del RSV pueden comprender adicionalmente al menos una proteína de matriz vírica (por ejemplo, una proteína M del RSV). En una realización, la proteína M se obtiene de una cepa humana del RSV. En otra realización, la proteína M se obtiene de una cepa bovina del RSV. En otras realizaciones, la proteína de matriz puede ser una proteína M1 de una cepa del virus de la gripe. En una realización, la cepa del virus de la gripe es una cepa de la gripe aviar. En una realización preferida, la cepa de gripe aviar es la cepa H5N1 A/Indonesia/5/05. En otras realizaciones, la proteína de matriz puede ser del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

En algunas realizaciones, las VLP pueden comprender adicionalmente una proteína G del RSV. En una realización, la proteína G puede ser del grupo A de HRSV. En otra realización, la proteína G puede ser del grupo B de HRSV. En otra realización más, la proteína G del RSV puede obtenerse del grupo A y/o grupo B de HRSV.

En algunas realizaciones, las VLP pueden comprender adicionalmente una proteína SH del RSV. En una realización, la proteína SH puede ser del grupo A de HRSV. En otras realizaciones, la proteína SH puede ser del grupo B de HRSV. En otra realización más, la proteína SH del RSV puede obtenerse del grupo A y/o grupo B de HRSV.

En algunas realizaciones, las VLP pueden comprender adicionalmente una proteína N del RSV. En una realización, la proteína N puede ser del grupo A de HRSV. En otra realización, la proteína N puede ser del grupo B de HRSV. En otra realización más, la proteína N del RSV puede obtenerse del grupo A y/o grupo B de HRSV.

En realizaciones adicionales, las VLP pueden comprender uno o más inmunógenos heterólogos, tales como hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) de la gripe.

En algunas realizaciones, la divulgación también comprende combinaciones de diferentes proteínas M, F, N, SH, y/o G del RSV de las mismas y/o diferentes cepas en una o más VLP. Además, las VLP pueden incluir una o más moléculas adicionales para la potenciación de una respuesta inmunitaria.

En otra realización de la divulgación, las VLP del RSV pueden portar agentes tales como ácidos nucleicos, ARNip, microARN, agentes quimioterapéuticos, agentes de imágenes y/u otros agentes que tienen que suministrarse a un paciente.

Las VLP de la divulgación son útiles para preparar vacunas y composiciones inmunogénicas. Una característica importante de las VLP es la capacidad de expresar proteínas de superficie de interés de modo que el sistema inmunológico de un vertebrado induzca una respuesta inmunitaria contra la proteína de interés. Sin embargo, no todas las proteínas pueden expresarse sobre la superficie de VLP. Puede haber muchas razones por las que no se expresan ciertas proteínas, o se expresan pobremente, sobre la superficie de VLP. Una razón es que la proteína no se dirige a la membrana de una célula hospedadora o que la proteína no tiene un dominio transmembrana. Como un ejemplo, secuencias cercanas al extremo carboxilo terminal de hemaglutinina de la gripe pueden ser importantes para la incorporación de HA a la bicapa lipídica de las nucleocápsidas con envuelta de la gripe maduras y para la interacción del ensamblaje de trímero HA con la proteína M1 de matriz de la gripe (Ali, *et al.*, (2000) *J. Virol.* 74, 8709-19).

Por tanto, una realización comprende VLP quiméricas que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos un inmunógeno que normalmente no se expresa de forma eficaz sobre la superficie celular y no es una proteína normal del RSV. En una realización, la proteína F modificada o mutada del RSV puede fusionarse con un inmunógeno de interés. En otra realización, la proteína F modificada o mutada del RSV se asocia con el inmunógeno mediante el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de una proteína de membrana de superficie vírica heteróloga, por ejemplo, la proteína de envuelta de MMTV.

Otras VLP quiméricas comprenden VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV y al menos una proteína de un agente infeccioso heterólogo. Ejemplos de agentes infecciosos heterólogos incluyen, aunque sin limitación, un virus, una bacteria, un protozoo, un hongo y/o un parásito. En una realización, el inmunógeno de otro agente infeccioso es una proteína vírica heteróloga. En otra realización, la proteína de un agente infeccioso heterólogo es una proteína asociada a envuelta. En otra realización, la proteína de otro agente infeccioso heterólogo se expresa sobre la superficie de VLP. En otra realización, la proteína de un agente infeccioso comprende un epítipo que generará una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado. En una realización, la proteína de otro agente infeccioso se co-expresa con una proteína F modificada o mutada del RSV. En otra realización, la proteína de otro agente infeccioso se fusiona a una proteína F modificada o mutada del RSV. En otra realización, solamente una parte de una proteína de otro agente infeccioso se fusiona a una proteína F modificada o mutada del RSV. En otra realización, solamente una parte de una proteína de otro agente infeccioso se fusiona a una parte de una proteína F modificada o mutada del RSV. En otra realización, la parte de la proteína de otro agente infeccioso fusionada a la proteína F modificada o mutada del RSV se expresa sobre la superficie de VLP.

La divulgación también abarca variantes de las proteínas expresadas sobre o en las VLP descritas en este documento. Las variantes pueden contener alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas constituyentes. El término "variante" con respecto a una proteína se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios "conservativos", donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, remplazo de leucina con isoleucina. Como alternativa, una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, remplazo de una glicina con un triptófano. Variaciones minoritarias análogas también pueden incluir delección o inserción de aminoácido, o ambas. Pueden encontrarse directrices en la determinación de qué restos de aminoácido pueden sustituirse, insertarse, o delecionarse sin eliminar actividad biológica o inmunológica, usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

Pueden aparecer variantes naturales debido a mutaciones en las proteínas. Estas mutaciones pueden conducir a variabilidad antigénica en grupos individuales de agentes infecciosos, por ejemplo, gripe. Por tanto, una persona infectada con, por ejemplo, una cepa de la gripe desarrolla anticuerpos contra ese virus, según aparecen cepas más nuevas del virus, los anticuerpos contra las cepas más antiguas ya no reconocen el virus más nuevo y puede suceder reinfección. La divulgación abarca toda variabilidad antigénica y genética de proteínas de agentes infecciosos para fabricar VLP.

Textos generales que describen técnicas de biología molecular, que son aplicables a la presente invención, tales como clonación, mutación, cultivo celular, y similares, incluyen Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, *Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 ("Sambrook") y *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols*, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., ("Ausubel"). Estos textos describen la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros tópicos relevantes relacionados con, por ejemplo, la clonación y mutación de moléculas F y/o G del RSV, etc. Por tanto, la divulgación también abarca el uso de métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante para mejorar o alterar las características de las proteínas expresadas sobre o en las VLP descritas en este documento. Pueden usarse diversos tipos de mutagénesis para producir y/o aislar ácidos nucleicos variantes que codifican moléculas proteicas y/o para modificar/mutar adicionalmente las proteínas en o sobre las VLP descritas en este documento. Incluyen, aunque sin limitación, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis puntual aleatoria, recombinación homóloga (reordenamiento de ADN), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo, mutagénesis dirigida por oligonucleótido, mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato, mutagénesis usando ADN dúplex con huecos o similares. Métodos adecuados adicionales incluyen reparación de desapareamientos puntuales, mutagénesis usando cepas hospedadoras deficientes en reparación, restricción-selección y restricción-purificación, mutagénesis por delección, mutagénesis por síntesis génica total, reparación de roturas bicatenarias, y similares. También se incluye la mutagénesis, por ejemplo, que implica construcciones quiméricas.

En la presente divulgación, en una realización, la mutagénesis puede estar guiada por información conocida de la molécula de origen natural o molécula de origen natural alterada o mutada, por ejemplo, secuencia, comparaciones de secuencia, propiedades físicas, estructura cristalina, o similares.

La divulgación comprende adicionalmente variantes proteicas que muestran actividad biológica sustancial, por ejemplo, capaces de provocar una respuesta eficaz de anticuerpos cuando se expresan sobre o en VLP descritas en este documento. Dichas variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones seleccionadas de acuerdo con normas generales conocidas en la técnica para tener poco efecto sobre la actividad.

En la técnica se conocen métodos de clonación de proteínas. Por ejemplo, el gen que codifica una proteína específica del RSV puede aislarse por RT-PCR a partir de ARNm poliadenilado extraído de células que se habían infectado con un virus RSV. El producto génico resultando puede clonarse como un inserto de ADN en un vector. El término "vector" se refiere al medio por el cual un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus,

fagémidos, transposones, cromosomas artificiales, y similares, que se replican de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto por ADN como por ARN dentro de la misma hebra, un ADN o ARN conjugado con polilisina, un ADN o ARN conjugado con péptido, un ADN conjugado con liposoma, o similares, es decir, sin replicación autónoma. En muchas realizaciones habituales, pero no todas, los vectores de la presente invención son plásmidos.

Por tanto, la divulgación comprende nucleótidos que codifican proteínas, incluyendo moléculas químéricas, clonadas en un vector de expresión que puede expresarse en una célula que induce la formación de VLP. Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido que es capaz de promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Normalmente, el ácido nucleico a expresarse está "unido de forma funcional" a un promotor y/o potenciador, y está sujeto a control regulador de la transcripción por el promotor y/o potenciador. En una realización, los nucleótidos codifican una proteína F modificada o mutada del RSV (de la invención). En otra realización, el vector comprende adicionalmente nucleótidos que codifican las proteínas M y/o G del RSV. En otra realización, el vector comprende adicionalmente nucleótidos que codifican las proteínas M y/o N del RSV. En otra realización, el vector comprende adicionalmente nucleótidos que codifican las proteínas M, G, y/o N del RSV. En otra realización, el vector comprende adicionalmente nucleótidos que codifican una proteína M de BRSV y/o proteínas N del RSV. En otra realización, el vector comprende adicionalmente nucleótidos que codifican una proteína M y/o G de BRSV, o una proteína HA y/o NA de la gripe. En un ejemplo, los nucleótidos codifican una proteína F del RSV y/o G del RSV modifica o mutada con una proteína HA y/o NA de la gripe. En otra realización, los nucleótidos codifican una proteína F del RSV modificada o mutada de la invención, y opcionalmente una proteína G de RSV con una proteína HA y/o NA de la gripe. En otra realización, el vector de expresión es un vector de baculovirus.

En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender mutaciones que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades de la proteína codificada o el modo en que se fabrican las proteínas. Pueden producirse variantes nucleotídicas por una diversidad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambio de codones en el ARNm humano por aquellos preferidos por células de insecto tales como células Sf9. Véase la publicación de patente de Estados Unidos 2005/0118191).

Además, los nucleótidos pueden secuenciarse para asegurar que se clonaron las regiones codificantes correctas y no contienen ninguna mutación indeseada. Los nucleótidos pueden subclonarse en un vector de expresión (por ejemplo, baculovirus) para su expresión en cualquier célula. Lo anterior es solamente un ejemplo del modo en que pueden clonarse proteínas víricas del RSV. Un experto en la materia entiende que están disponibles y son posibles métodos adicionales.

La divulgación también proporciona construcciones y/o vectores que comprenden nucleótidos del RSV que codifican genes estructurales del RSV, incluyendo proteínas F, M, G, N, SH, de la invención, o partes de las mismas y/o cualquier molécula química descrita anteriormente. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector vírico, o retrovírico. Las construcciones y/o vectores que comprenden genes estructurales del RSV, incluyendo F, M, G, N, SH, o partes de los mismos y/o cualquier molécula química descrita anteriormente, deben unirse de forma funcional a un promotor apropiado, tal como el promotor de la polihedrina de AcMNPV (u otro baculovirus), el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, phoA y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40, y promotores de LTR retrovíricos que son ejemplos no limitantes. Otros promotores adecuados serán conocidos para los expertos en la materia dependiendo de la célula hospedadora y/o la tasa de expresión deseada. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para el inicio de la transcripción, la terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresada por las construcciones incluirá preferiblemente un codón de inicio de la traducción al inicio y un codón de terminación apropiadamente posicionado al final del polipéptido a traducir.

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador de selección. Dichos marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Entre los vectores preferidos están los vectores víricos, tales como baculovirus, poxvirus (por ejemplo, virus vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, virus de la viruela de las aves de corral, virus de la viruela del mapache, virus de la viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), herpesvirus, y retrovirus. Otros vectores que pueden usarse con la invención comprenden vectores para su uso en bacterias que comprenden pQE70, pQE60 y pQE-9, vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5. Entre los vectores eucariotas preferidos están pFastBac1 pW INEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVL. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. En una realización, el vector que comprende nucleótidos que codifican genes del RSV incluyendo genes F modificados o mutados del RSV de la invención, así como genes para M, G, N, SH o partes de las mismas, y/o cualquier molécula química descrita anteriormente, es pFastBac.

Las construcciones recombinantes mencionadas anteriormente podrían usarse para transfectar, infectar, o transformar y pueden expresar proteínas del RSV, incluyendo una proteína F modificada o mutada del RSV y al menos un inmunógeno. En un ejemplo, la construcción recombinante comprende una proteína F, M, G, N, SH, modifica o mutada

del RSV, o partes de las mismas, y/o cualquier molécula descrita anteriormente, en células eucariotas y/o células procariotas. Por tanto, la divulgación proporciona células hospedadoras que comprenden un vector (o vectores) que contiene ácidos nucleicos que codifican genes estructurales del RSV, incluyendo una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención; y al menos un inmunógeno tal como, aunque sin limitación, proteína G, N, y SH del RSV, o partes de las mismas y/o cualquier molécula descrita anteriormente, y que permite la expresión de genes, incluyendo F, G, N, M, o SH del RSV o partes de los mismos, y/o cualquier molécula descrita anteriormente en la célula hospedadora en condiciones que permitan la formación de VLP.

Entre las células hospedadoras eucariotas están células hospedadoras de levadura, insecto, aviar, vegetales, de *C. elegans* (o nemátodos) y de mamífero. Ejemplos no limitantes de células de insectos son células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo, Sf9, Sf21, células de *Trichoplusia ni*, por ejemplo, células High Five, y células S2 de *Drosophila*. Ejemplos de células hospedadoras de hongos (incluyendo levaduras) son *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), especies de *Candida* incluyendo *C. albicans* y *C. glabrata*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris*, y *Yarrowia lipolytica*. Ejemplos de células de mamífero son células COS, células renales de cría de hámster, células L de ratón, células LNCaP, células de ovario de hámster chino (CHO), células renales embrionarias humanas (HEK), y células de mono verde africano, células CV1, células HeLa, células MDCK, células Vero y Hep-2. También pueden usarse ovocitos de *Xenopus laevis*, u otras células de origen anfibio. Ejemplos de células hospedadoras procariotas incluyen células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi* y micobacterias.

Los vectores, por ejemplo, vectores que comprenden polinucleótidos de una proteína F modificada o mutada del RSV; y al menos un inmunógeno incluyendo, aunque sin limitación, proteína G, N o SH del RSV o partes de las mismas, y/o cualquier molécula quimérica descrita anteriormente, pueden transfectarse en células hospedadoras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos en células eucariotas puede ser por coprecipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. En una realización, el vector es un Baculovirus recombinante. En otra realización, el baculovirus recombinante se transfecta en una célula eucariota. En una realización preferida, la célula es una célula de insecto. En otra realización, la célula de insecto es una célula Sf9.

Esta divulgación también proporciona construcciones y métodos que aumentarán la eficacia de la producción de VLP. Por ejemplo, la adición de secuencia líder a la proteína F, M, G, N, SH, del RSV o partes de las mismas y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente, puede mejorar la eficacia del transporte de proteínas dentro de la célula. Por ejemplo, puede fusionarse una secuencia señal heteróloga a la proteína F, M, G, N, SH o partes de las mismas y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente. En una realización, la secuencia señal puede obtenerse del gen de una célula de insecto y fusionarse a la proteína F, M, G, N, SH o partes de las mismas, y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente. En otra realización, el péptido señal es la secuencia señal de quitinasa, que trabaja de forma eficaz en sistemas de expresión de baculovirus.

Otro método para aumentar la eficacia de la producción de VLP es optimizar los codones de los nucleótidos que codifican RSV incluyendo una proteína F modificada o mutada, M, G, N, SH del RSV o partes de las mismas y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente para un tipo celular específico. Para ejemplos de optimización de codones de ácidos nucleicos para la expresión en células Sf9 véanse las SEQ ID No: 3, 5, 7, 9, 13, 17, 19, y 25.

La presente divulgación también proporciona métodos de producción de VLP, comprendiendo los métodos expresar genes del RSV incluyendo una proteína F modificada o mutada del RSV, y al menos una proteína adicional, incluyendo, aunque sin limitación, la proteína M, G, N, SH del RSV o partes de las mismas y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente en condiciones que permite la formación de VLP. Dependiendo del sistema de expresión y la célula hospedadora seleccionada, las VLP se producen cultivando células hospedadoras transformadas por un vector de expresión en condiciones mediante las cuales se expresan las proteínas recombinantes y se forman VLP. Se divulga el método de producción de una VLP, que comprende transfectar vectores que codifican al menos una proteína F modificada o mutada del RSV en una célula hospedadora adecuada y expresar la proteína F modificada o mutada del RSV en condiciones que permiten la formación de VLP. En otro ejemplo, la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en células de levadura, insecto, anfibio, ave, o mamífero. La selección de las condiciones apropiadas de cultivo pertenece a las habilidades de los expertos en la materia.

Los métodos para cultivar células modificadas por ingeniería para producir VLP de la divulgación incluyen, aunque sin limitación, técnicas de cultivo celular discontinuo, semicontinuo, continuo y por perfusión. Cultivo celular significa el crecimiento y propagación de células en un biorreactor (una cámara de fermentación) donde las células se propagan y expresan proteína (por ejemplo, proteínas recombinantes) para su purificación y aislamiento. Típicamente, el cultivo celular se realiza en condiciones estériles de temperatura y atmósfera controladas en un biorreactor. Un biorreactor es una cámara usada para cultivar células en que las condiciones ambientales tales como temperatura, atmósfera, agitación y/o pH pueden controlarse. En un ejemplo, el biorreactor es una cámara de acero inoxidable. En otro ejemplo, el biorreactor es una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo, Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, NJ). En otro ejemplo, las bolsas de plástico preesterilizadas son bolsas de aproximadamente 50 l a 1000 l.

Las VLP después se aíslan usando métodos que conservan la integridad de las mismas, tal como por centrifugación

en gradiente, por ejemplo, cloruro de cesio, sacarosa o iodixanol, así como técnicas convencionales de purificación incluyendo, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y de filtración en gel.

Lo siguiente es un ejemplo del modo en que las VLP pueden prepararse, aislarse y purificarse. Habitualmente, se producen VLP a partir de líneas celulares recombinantes modificadas por ingeniería para crear VLP cuando las células se cultivan en cultivo celular (véase anteriormente). Un experto en la materia entendería que existen métodos adicionales que pueden utilizarse para preparar y purificar VLP de la divulgación, por tanto, la divulgación no se limita a VLPs hechos y purificados utilizando el método descrito.

La producción de VLP puede comenzar sembrando células Sf9 (no infectadas) en matraces de agitación, permitiendo que las células se expandan y aumenten en escala según crecen las células y se multiplican (por ejemplo, desde un matraz de 125 ml hasta una bolsa Wave de 50 l). El medio usado para cultivar la célula se formula para la línea celular apropiada (preferiblemente, medio sin suero, por ejemplo, medio de insecto ExCell-420, JRH). A continuación, las células se infectan con baculovirus recombinante a la multiplicidad más eficaz de infección (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades formadoras de placas por célula). Una vez ha sucedido la infección, la proteína F modificada o mutada, M, G, N, SH del RSV o partes de las mismas, y/o cualquier molécula química o heteróloga descrita anteriormente, se expresa a partir del genoma del virus, se autoensambla en VLP y se secreta de las células aproximadamente 24 a 72 horas postinfección. Habitualmente, la infección es más eficaz cuando las células están en fase semi-log de crecimiento ($4-8 \times 10^6$ células/ml) y son al menos aproximadamente un 90 % viables.

Las VLP pueden recogerse aproximadamente 48 a 96 horas postinfección, cuando los niveles de VLP en el medio de cultivo celular están cerca del máximo, pero antes de lisis celular extensiva. La densidad de células Sf9 y viabilidad en el tiempo de recolección puede ser de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ml hasta aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con al menos un 20 % de viabilidad, como se muestra por el ensayo de exclusión de colorante. A continuación, el medio se retira y aclara. Puede añadirse NaCl al medio hasta una concentración de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,0 M, preferiblemente hasta aproximadamente 0,5 M, para evitar la agregación de VLP. La retirada de células y desechos celulares del medio de cultivo celular que contiene VLP puede conseguirse por filtración en flujo tangencial (TFF) con un cartucho de filtro de 0,5 o 1,00 μm de fibra hueca preesterilizada de un único uso o un dispositivo similar.

A continuación, las VLP en el medio de cultivo aclarado pueden concentrarse por ultrafiltración usando un cartucho de fibra hueca de punto de corte de peso molecular de 500.000 preesterilizado, desechable. Las VLP concentradas pueden diafiltrarse frente a 10 volúmenes de solución salina tampona con fosfato (PBS) de pH 7,0 a 8,0 que contiene NaCl 0,5 M para retirar los componentes residuales del medio.

Las VLP diafiltradas y concentradas pueden purificarse adicionalmente en un gradiente de sacarosa discontinuo del 20 % al 60 % en tampón PBS pH 7,2 con NaCl 0,5 M por centrifugación a $6.500 \times g$ durante 18 horas a aproximadamente 4 °C hasta aproximadamente 10 °C. Habitualmente, las VLP formarán una banda visible distintiva entre sacarosa a aproximadamente el 30 % hasta aproximadamente el 40 % o en la superficie de contacto (en un gradiente por etapas del 20 % y el 60 %) que puede recogerse del gradiente y almacenarse. Este producto puede diluirse para que comprenda 200 mM de NaCl en la preparación para la siguiente etapa en el proceso de purificación. Este producto contiene VLP y puede contener partículas intactas de baculovirus.

La purificación adicional de VLP puede conseguirse por cromatografía de intercambio aniónico, o centrifugación en lecho isopícnico de sacarosa al 44 %. En cromatografía de intercambio aniónico, la muestra procedente del gradiente de sacarosa (véase anteriormente) se carga en columna que contiene un medio con un anión (por ejemplo, Matrix Fractogel EMD TMAE) y se eluye mediante un gradiente salino (desde aproximadamente 0,2 M hasta aproximadamente 1,0 M de NaCl) que puede separar las VLP de otros contaminantes (por ejemplo, baculovirus y ADN/ARN). En el método de lecho de sacarosa, la muestra que comprende las VLP se añade a un lecho de sacarosa al 44 % y se centrifuga durante aproximadamente 18 horas a $30.000 \times g$. Las VLP forman una banda en la parte superior de la sacarosa al 44 %, mientras que el baculovirus precipita en el fondo y otras proteínas contaminantes permanecen en la capa de sacarosa al 0 % en la parte superior. Se recoge el pico o banda de VLP.

El baculovirus intacto puede inactivarse, si se desea. La inactivación puede conseguirse por métodos químicos, por ejemplo, formalina o β -propiolactona (BPL). La retirada y/o inactivación de baculovirus intacto también puede conseguirse en gran medida usando precipitación selectiva y métodos cromatográficos conocidos en la técnica, como se ha ejemplificado anteriormente. Los métodos de inactivación comprenden incubar la muestra que contiene las VLP en un 0,2 % de BPL durante 3 horas a aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 27 °C. El baculovirus también puede inactivarse incubando la muestra que contiene las VLP en BPL al 0,05 % a 4 °C durante 3 días, después a 37 °C durante una hora.

Después de la etapa de inactivación/retirada el producto que comprende VLP puede procesarse a través de otra etapa de diafiltración para retirar cualquier reactivo de la etapa de inactivación y/o cualquier sacarosa residual, y para colocar las VLP en el tampón deseado (por ejemplo, PBS). La solución que comprende VLP puede esterilizarse por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, filtración estéril) y almacenarse en el refrigerador o congelador.

Las técnicas anteriores pueden ponerse en práctica a través de una diversidad de escalas. Por ejemplo, matraces en T, matraces de agitación, frascos rotativos, hasta biorreactores de tamaño industrial. Los biorreactores pueden comprender un tanque de acero inoxidable o una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo, el sistema vendido por Wave Biotech, Bridgewater, NJ). Un experto en la materia sabrá lo que es más deseable para estos propósitos.

- 5 La expansión y producción de vectores de expresión de baculovirus e infección de células con baculovirus recombinante para producir VLP del RSV recombinante pueden conseguirse en células de insecto, por ejemplo, células de insecto Sf9 como se ha descrito previamente. En un ejemplo, las células son Sf9 infectadas con baculovirus recombinante modificado por ingeniería para producir VLP del RSV.

Formulaciones farmacéuticas o de vacuna y administración

- 10 Las composiciones farmacéuticas útiles en este documento contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, que incluye cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de una respuesta inmunitaria dañina para el vertebrado que recibe la composición, y que puede administrarse sin toxicidad excesiva y una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que
15 comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos, Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en mamíferos, y más particularmente en seres humanos. Estas composiciones pueden ser útiles como una vacuna y/o composiciones
20 antigénicas para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado.

- La divulgación abarca una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP que comprenden al menos una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, y al menos una proteína adicional, incluyendo, aunque sin limitación, proteína M, G, N, SH del RSV o partes de las mismas, y/o cualquier molécula quimérica o heteróloga descrita anteriormente. En una realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable
25 comprende VLP que comprenden al menos una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos un inmunógeno adicional. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden al menos una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos una proteína M del RSV. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden al menos una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos una proteína M1 de la BRSV. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden
30 al menos una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos una proteína M1 de influenza. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden al menos una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos una proteína M1 de la gripe aviar.

- En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden
35 adicionalmente una proteína G del RSV, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína G de HRSV, BRSV o RSV aviar. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden adicionalmente la proteína N del RSV, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína N de HRSV, BRSV o RSV aviar. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden adicionalmente la proteína SH del RSV, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína SH de HRSV, BRSV o RSV
40 aviar.

- En otra realización, la divulgación abarca una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP quiméricas tales como VLP que comprenden la proteína M de BRSV y una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y/o proteína G, H, o SH de un RSV y opcionalmente la proteína HA o NA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína HA o NA está fusionada a un dominio transmembrana y cola citoplasmática de la proteína
45 F y/o G del RSV.

La divulgación también abarca una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende la proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención.

- En una realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden una
50 proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos una proteína adicional. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden adicionalmente la proteína M del RSV, tal como, aunque sin limitación, una proteína M de BRSV. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden adicionalmente la proteína G del RSV, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína G de HRSV. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente
55 aceptable comprende VLP que comprenden adicionalmente la proteína N del RSV, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína N de HRSV, BRSV o RSV aviar. En otra realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden adicionalmente la proteína SH del RSV, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína SH de HRSV, BRSV o RSV aviar. En otro ejemplo, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden la proteína M de BRSV y la proteína F y/o G del grupo A de HRSV. En otro
60 ejemplo, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden la proteína M de

BRSV y la proteína F y/o G del grupo B de HRSV. La presente divulgación proporciona una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP quiméricas tales como VLP que comprenden proteína M quimérica de un BRSV y opcionalmente la proteína HA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína M está fusionada a la proteína HA de la gripe. La presente divulgación proporciona una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP quiméricas tales como VLP que comprenden la proteína M de BRSV, y una proteína F y/o G quimérica de un RSV y opcionalmente la proteína HA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína HA de la gripe quimérica está fusionada al dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV. En otra realización, la divulgación abarca una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP quiméricas tales como VLP que comprenden la proteína M de BRSV y una F quimérica de la invención y opcionalmente una proteína G de un RSV y opcionalmente una proteína HA derivada de un virus de la gripe, en el que la proteína HA de la gripe quimérica se fusiona con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV. La presente divulgación proporciona una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP quiméricas tales como VLP que comprenden M de BRSV y una proteína F y/o G quimérica de un RSV y opcionalmente proteína HA o NA derivada de un virus de la gripe, en el que la proteína HA o NA es un fusionado con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV. En otra realización, la divulgación abarca una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende VLP quiméricas tales como VLP que comprenden M y un F quimérico del BRSV de la invención y opcionalmente una proteína F y/o G quimérica de un RSV y opcionalmente la proteína HA o NA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína HA o NA está fusionada al dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV.

La divulgación también abarca una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende una VLP quimérica que comprende al menos una proteína del RSV de la invención. En una realización, la composición de vacuna farmacéuticamente aceptable comprende VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención y al menos un inmunógeno de un agente infeccioso heterólogo o célula enferma. En otra realización, el inmunógeno de un agente infeccioso heterólogo es una proteína vírica. En otra realización, la proteína vírica de un agente infeccioso heterólogo es una proteína asociada con la envuelta. En otra realización, la proteína vírica de un agente infeccioso heterólogo se expresa sobre la superficie de las VLP. En otra realización, la proteína de un agente infeccioso comprende un epítipo que generará una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado.

La divulgación también abarca un kit para inmunizar un vertebrado, tal como un sujeto humano, que comprende VLP que comprenden al menos una proteína del RSV de la invención. En una realización, el kit comprende VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En una realización, el kit comprende adicionalmente una proteína M del RSV tal como una proteína M del BRSV. En otra realización, el kit comprende adicionalmente una proteína G del RSV. Se proporciona en este documento un kit que comprende VLP que comprenden una proteína M quimérica de un BRSV y opcionalmente una proteína HA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína M está fusionada a la proteína M de BRSV. Se proporciona en este documento un kit que comprende VLP que comprenden una proteína M quimérica de un BRSV, una proteína F y/o G del RSV y un inmunógeno de un agente infeccioso heterólogo. En otra realización, la divulgación abarca un kit que comprende VLPs que comprenden una proteína M quimérica de un BRSV, un F del RSV de la invención y opcionalmente una proteína G y un inmunógeno de un agente infeccioso heterólogo. Se proporciona en este documento un kit que comprende VLP que comprenden una proteína M de un BRSV, una proteína F y/o G quimérica del RSV y opcionalmente una proteína HA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína HA está fusionada al dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F o G del RSV. En otra realización, la divulgación abarca un kit que comprende VLP que comprenden una proteína M de un BRSV, una F del RSV quimérico de la invención y opcionalmente, una proteína G y opcionalmente una proteína HA derivada de un virus de la gripe, donde la proteína HA se fusiona con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F o G del RSV. En el presente documento se proporciona un kit que comprende VLP que comprenden proteína M de un BRSV, una proteína F y/o G del RSV quimérico y opcionalmente proteína HA o NA derivada de un virus de la gripe, en el que la proteína HA se fusiona con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática del proteína F y/o G del RSV. En otra realización, la divulgación abarca un kit que comprende VLP que comprenden proteína M de un BRSV, un F quimérico del RSV de la invención y opcionalmente una proteína G y opcionalmente una proteína HA o NA derivada de un virus de la gripe, donde la proteína HA está fusionada al dominio transmembrana y cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV.

En una realización, la invención comprende una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En otra realización, la divulgación comprende una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención. En otra realización más, la divulgación comprende una formulación inmunogénica que comprende al menos una dosis eficaz de una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención.

La formulación inmunogénica de la divulgación comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela S del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril, y combinaciones de los mismos. Se presenta un análisis minucioso de vehículos, diluyentes, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. edición actual). La formulación debe adecuarse al modo de

administración. En una realización preferida, la formulación es adecuada para administración a seres humanos, preferiblemente es estéril, no particulada y/o no pirógena.

La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de un agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición puede ser una forma sólida, tal como un polvo liofilizado adecuado para reconstitución, una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La divulgación también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las formulaciones de vacuna de la invención. En una realización preferida, el kit comprende dos recipientes, uno que contiene una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención, y el otro que contiene un adyuvante. Asociado con dicho recipiente o recipientes puede haber una notificación en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso y venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicha notificación la aprobación por la agencia de fabricación, uso y venta para administración a seres humanos.

La divulgación también proporciona que la formulación está envasada en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de composición. En una realización, la composición se suministra como un líquido, en otra realización, como un polvo liofilizado y esterilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para administración a un sujeto.

En una realización alternativa, la composición se suministra en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración de la composición. Preferiblemente, la forma líquida de la composición se suministra en un recipiente sellado herméticamente de al menos aproximadamente 50 µg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 200 µg/ml, al menos 500 µg/ml, o al menos 1 mg/ml.

Como un ejemplo, se administran VLP del RSV quimérico que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV de la invención en una cantidad o cuantía eficaz (como se ha definido anteriormente) suficiente para estimular una respuesta inmunitaria, cada una, una respuesta contra una o más cepas del RSV. La administración de la proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o VLP provoca inmunidad contra RSV. Normalmente, la dosis puede ajustarse dentro de este intervalo basándose en, por ejemplo, la edad, estado físico, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, y otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra de forma sistémica, por ejemplo, por inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja o jeringa, o un dispositivo de inyección sin aguja. Como alternativa, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, mediante gotas, aerosol de partículas grandes (mayores de 10 micrómetros), o pulverización en el tracto respiratorio superior. Aunque cualquiera de las vías anteriores de suministro provoca una respuesta inmunitaria, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad en la mucosa en el sitio de entrada de muchos virus, incluyendo RSV y gripe .

Por tanto, se proporciona un método de formulación de una vacuna o composición antigénica que induce inmunidad contra una infección o al menos un síntoma de enfermedad de la misma a un mamífero, que comprende añadir a la formulación una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. En un ejemplo, la infección es una infección por RSV.

Aunque la estimulación de la inmunidad con una única dosis es posible, pueden administrarse dosificaciones adicionales, por la misma vía o una vía diferente, para conseguir el efecto deseado. En neonatos y bebés, por ejemplo, pueden requerirse múltiples administraciones para producir niveles suficientes de inmunidad. La administración puede continuar a intervalos durante toda la infancia, según sea necesario para mantener niveles suficientes de protección contra las infecciones, por ejemplo, infección por RSV. Asimismo, los adultos que son particularmente susceptibles a infecciones repetidas o graves, tales como, por ejemplo, trabajadores sanitarios, trabajadores de guarderías, miembros de la familia de niños pequeños, los ancianos, e individuos con función cardiopulmonar comprometida pueden requerir múltiples inmunizaciones para establecer y/o mantener respuestas inmunitarias protectoras. Los niveles de inmunidad inducida pueden controlarse, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos de secreción y séricos neutralizantes, y ajustando las dosis o vacunaciones repetidas según lo necesario para producir y mantener niveles deseados de protección.

Los métodos de administración de una composición que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV (por ejemplo, formulaciones de vacuna y/o antigénicas) incluyen, aunque sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intravenosa y subcutánea), epidural, y a la mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral o pulmonar o por supositorios). En un ejemplo específico, las composiciones de la presente invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica

o intradérmica. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, moco oral, colon, conjuntiva, nasofaringe, orofaringe, vagina, uretra, vejiga urinaria y mucosa intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. En algunos ejemplos, las vías intranasales u otras vías a la mucosa de administración de una composición de la invención pueden inducir una respuesta de anticuerpos u otra respuesta inmunitaria que es sustancialmente mayor que otras vías de administración. En otro ejemplo, las vías intranasal u otras vías a la mucosa de administración de una composición de la invención pueden inducir una respuesta de anticuerpos u otra respuesta inmunitaria que inducirá protección cruzada contra otras cepas del RSV. La administración puede ser sistémica o local.

En otro ejemplo más, la vacuna y/o formulación inmunogénica se administra de tal modo que se abordan tejidos de la mucosa para provocar una respuesta inmunitaria en el sitio de inmunización. Por ejemplo, los tejidos de la mucosa tales como el tejido linfóide asociado al intestino (GALT) pueden abordarse para inmunización usando administración oral de composiciones que contienen adyuvantes con propiedades particulares de direccionamiento a la mucosa. También pueden abordarse tejidos adicionales de la mucosa, tales como tejido linfóide nasofaríngeo (NALT) y tejido linfóide asociado con los bronquios (BALT).

Las vacunas y/o formulaciones inmunogénicas de la invención también pueden administrarse en un programa de dosificación, por ejemplo, una administración inicial de la composición de vacuna con posteriores administraciones de refuerzo. En ejemplos particulares, se administra una segunda dosis de la composición en cualquier momento desde dos semanas a un año, preferiblemente de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 a aproximadamente 6 meses, después de la administración inicial. Adicionalmente, puede administrarse una tercera dosis después de la segunda dosis y desde aproximadamente tres meses hasta aproximadamente dos años, incluso más, preferiblemente aproximadamente 4, aproximadamente 5, o aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 7 meses hasta aproximadamente un año después de la administración inicial. La tercera dosis puede administrarse opcionalmente cuando no se detectan o se detectan niveles bajos de inmunoglobulinas específicas en el suero y/o la orina o secreciones de la mucosa del sujeto después de la segunda dosis. En un ejemplo preferido, se administra una segunda dosis aproximadamente un mes después de la primera administración y se administra una tercera dosis aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otro ejemplo, la segunda dosis se administra aproximadamente seis meses después de la primera administración. En otro ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden formularse con otras composiciones inmunogénicas, antivíricos y/o antibióticos.

La dosificación de la composición farmacéutica puede determinarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, identificando primero dosis eficaces para provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica, por ejemplo, midiendo el título en suero de inmunoglobulinas específicas del virus o midiendo la relación inhibidora de anticuerpos en muestras de suero, o muestras de orina, o secreciones de la mucosa. Las dosificaciones pueden determinarse para estudios en animales. Una lista no limitante de animales usados para estudiar la eficacia de vacunas incluye cobaya, hámster, hurón, chinchilla, ratón y rata del algodón. La mayoría de los animales no son hospedadores naturales para los agentes infecciosos, pero aún pueden servir en los estudios de diversos aspectos de la enfermedad. Por ejemplo, a cualquiera de los animales anteriores se les puede dosificar un candidato de vacuna, por ejemplo, proteínas F modificadas o mutadas del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o VLP, para caracterizar parcialmente la respuesta inmunitaria inducida, y/o para determinar si se ha producido algún anticuerpo neutralizante. Por ejemplo, se han realizado muchos estudios en el modelo de ratón porque los ratones son de tamaño pequeño y su bajo coste permite a los investigadores realizar estudios a mayor escala.

Además, pueden realizarse estudios clínicos en seres humanos para determinar la dosis eficaz preferida para seres humanos por un experto en la materia. Dichos estudios clínicos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. La dosis precisa a emplear también dependerá de la vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de respuesta a dosis obtenidas sistemas de ensayo *in vivo* o en animales.

Como también se sabe bien en la técnica, la inmunogenicidad de una composición particular puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes se han usado experimentalmente para promover un aumento generalizado en la inmunidad contra antígenos desconocidos (por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 4.877.611). Los protocolos de inmunización han usado adyuvantes para estimular respuestas durante muchos años, y por tanto, los adyuvantes son bien conocidos para los expertos en la materia. Algunos adyuvantes afectan al modo en que se presentan los antígenos. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria se aumenta cuando los antígenos proteicos se precipitan por alumbre. La emulsificación de antígenos también prolonga la duración de la presentación del antígeno. La inclusión de cualquier adyuvante descrito en Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2ª Edición)", está prevista dentro del alcance de esta invención.

Adyuvantes de ejemplos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivado), adyuvante incompleto de Freundy adyuvante de hidróxido de aluminio. Otros adyuvantes comprenden GMCSF, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos MDP, tales

como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil lípido A (MPL). También se contempla RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS) en una emulsión de eucaleno/Tween 80. También puede usarse MF-59, Novasomes®, antígenos MHC.

En una realización de la invención, el adyuvante es una vesícula lipídica paucilamelar que tiene aproximadamente dos a diez bicapas dispuestas en forma de carcassas sustancialmente esféricas separadas por capas acuosas que rodean una gran cavidad central amorfa libre de bicapas lipídicas. Las vesículas lipídicas paucilamelares pueden actuar estimulando la respuesta inmunitaria de varios modos, como estimuladores no específicos, como vehículos para el antígeno, como vehículos de adyuvantes adicionales, y combinaciones de los mismos. Las vesículas lipídicas paucilamelares actúan como inmunoestimuladores no específicos cuando, por ejemplo, se prepara una vacuna entremezclando el antígeno con las vesículas preformadas de modo que el antígeno permanezca de forma extracelular a las vesículas. Por encapsulación de un antígeno dentro de la cavidad central de la vesícula, la vesícula actúa tanto como inmunoestimulador y como vehículo para el antígeno. En otra realización, las vesículas se preparan principalmente de vesículas no fosfolipídicas. En otra realización, las vesículas son Novasomes®. Novasomes® son vesículas no fosfolipídicas paucilamelares que varían de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 500 nm. Comprenden Brij 72, colesterol, ácido oleico y eucaleno. Novasomes ha demostrado ser un adyuvante eficaz para antígenos de gripe (véanse las patentes de Estados Unidos 5.629.021, 6.387.373, y 4.911.928).

Las composiciones de la invención también pueden formularse con "inmunoestimuladores". Estos son los mensajeros químicos del propio organismo (citoquinas) para aumentar la respuesta del sistema inmunológico. Los inmunoestimuladores incluyen, aunque sin limitación, diversas citoquinas, linfoquinas y quimioquinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulador de colonias (CSF) de granulocitos-macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que las composiciones de la invención, o pueden administrarse por separado. La proteína o un vector de expresión que codifica la proteína pueden administrarse para producir un efecto inmunoestimulador. Por tanto, en una realización, la divulgación comprende formulaciones antigénicas y de vacuna que comprenden un adyuvante y/o un inmunoestimulador.

Métodos de estimulación de una respuesta inmunitaria

Las proteínas F modificadas o mutadas del RSV, las micelas F del RSV que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV, o las VLP descritas aquí son útiles para preparar composiciones que estimulan una respuesta inmunitaria que confiere inmunidad o inmunidad sustancial contra agentes infecciosos. La inmunidad tanto de la mucosa como celular puede contribuir a inmunidad contra agentes infecciosos y enfermedades. Los anticuerpos secretados de forma local en el tracto respiratorio superior son un factor principal en la resistencia a infección natural. La inmunoglobulina A de secreción (sIgA) está implicada en la protección del tracto respiratorio superior y la IgG en suero en la protección del tracto respiratorio inferior. La respuesta inmunitaria inducida por una infección protege contra reinfección con el mismo virus o una cepa vírica antígenicamente similar. Por ejemplo, RSV experimenta cambios frecuentes e impredecibles; por lo tanto, después de infección natural, el período eficaz de protección proporcionado por la inmunidad del hospedador puede ser solamente eficaz durante unos pocos años contra las nuevas cepas de virus que circulan en la comunidad.

Por tanto, se proporciona un método de inducción de inmunidad contra infecciones o al menos un síntoma de enfermedad de las mismas en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

En un ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV y al menos una proteína adicional. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente una proteína M del RSV, por ejemplo, una proteína M de BRSV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente una proteína N del RSV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente una proteína G del RSV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente una proteína SH del RSV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente proteína F y/o G del grupo y/o grupo B de HRSV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden proteína M de BRSV y una proteína F y/o G quimérica del RSV o proteína de envuelta de MMTV, por ejemplo, la proteína HA o NA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína HA y/o NA está fusionada al dominio transmembrana y cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV o proteína de envuelta de MMTV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden proteína M de BRSV y una proteína F y/o G quimérica del RSV y opcionalmente proteína HA o NA obtenida de un virus de la gripe, donde la proteína HA o NA está fusionada al dominio transmembrana y cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV. En otro ejemplo, el sujeto es un mamífero. En otro ejemplo, el mamífero es un ser humano. En otro ejemplo, las VLP del RSV se formulan con un adyuvante o inmunoestimulador.

Se proporciona un método para inducir inmunidad a la infección por RSV o al menos un síntoma de la enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F de RSV modificada o mutada.

También se proporciona un método para inducir inmunidad a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. También se proporciona un método para inducir inmunidad a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una VLP del RSV, en donde los VLP comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV, proteínas M, G, SH y/o N. En otro ejemplo, un método para inducir inmunidad a la infección por RSV o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende administrar al menos una dosis efectiva de una VLP del RSV, donde el VLP consiste esencialmente en proteínas M del BRSV (incluyendo M quimérica) y F, G y/o N del RSV. Las VLP pueden comprender proteínas del RSV adicionales y/o contaminantes proteicos en concentraciones insignificantes. En otro ejemplo, un método para inducir inmunidad a la infección por RSV o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, comprende administrar al menos una dosis efectiva de los VLP del RSV, donde los VLP consisten en M del BRSV (incluyendo M quimérica), G y/o F del RSV. En otro ejemplo, un método para inducir inmunidad a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, comprende administrar al menos una dosis efectiva de los VLP del RSV que comprende proteínas del RSV, en donde las proteínas del RSV consisten en proteínas M F, G y / o N del BRSV (incluyendo M quiméricas), incluidas las proteínas quiméricas F, G y/o N. Estas VLP contienen proteínas M del BRSV (incluidas las proteínas quiméricas M), F, G y/o N del RSV y pueden contener constituyentes celulares adicionales tales como proteínas celulares, proteínas de baculovirus, lípidos, carbohidratos, etc., pero no contienen proteínas del RSV adicionales (diferentes de los fragmentos de las proteínas M del BRSV (incluyendo M quiméricas), F, G y/o N del BRSV/RSV. En otro ejemplo, el sujeto es un vertebrado. En un ejemplo, el vertebrado es un mamífero. En otro ejemplo, el mamífero es humano. En otro ejemplo, el método comprende inducir inmunidad a la infección por VRS o al menos un síntoma de la enfermedad mediante la administración de la formulación en una dosis. En otro ejemplo, el método comprende inducir inmunidad a la infección por VRS o al menos un síntoma de la enfermedad mediante la administración de la formulación en múltiples dosis.

La presente divulgación también abarca la inducción de inmunidad contra una infección, o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, causada por un agente infeccioso, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

En un ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV y al menos una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En un ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV y al menos una proteína del mismo agente infeccioso o uno heterólogo. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso heterólogo es una proteína vírica. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso es una proteína asociada con envuelta. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso se expresa sobre la superficie de VLP. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso comprende un epítipo que generará una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso puede asociarse con la proteína M del RSV tal como proteína M de BRSV, proteína F, G y/o N del RSV. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso está fusionada a una proteína del RSV tal como proteína M de BRSV, proteína F, G y/o N del RSV. En otro ejemplo, solamente una parte de una proteína del agente infeccioso está fusionada a una proteína del RSV tal como una proteína M de BRSV, proteína F, G y/o N del RSV. En otro ejemplo, la parte de la proteína del agente infeccioso fusionada a la proteína del RSV se expresa sobre la superficie de VLP. En otro ejemplo, la proteína del RSV, o parte de la misma, fusionada a la proteína del agente infeccioso se asocia con la proteína M del RSV. En otro ejemplo, la proteína del RSV, o parte de la misma se obtiene de la proteína F, G, N y/o P del RSV. En otro ejemplo, las VLP quiméricas comprenden adicionalmente la proteína N y/o P del RSV. En otro ejemplo, las VLP quiméricas comprenden más de una proteína del mismo agente infeccioso y/o uno heterólogo. En otro ejemplo, las VLP quiméricas comprenden más de una proteína de agente infeccioso, creando de ese modo una VLP multivalente.

Las composiciones de la invención pueden inducir inmunidad sustancial en un vertebrado (por ejemplo, un ser humano) cuando se administran al vertebrado. La inmunidad sustancial resulta de una respuesta inmunitaria contra composiciones de la invención que protege o mejora la infección o al menos reduce un síntoma de infección en el vertebrado. En algunos casos, si el vertebrado se infecta, la infección será asintomática. La respuesta puede no ser una respuesta completamente protectora. En este caso, si el vertebrado se infecta con un agente infeccioso, el vertebrado experimentará síntomas reducidos o una duración más corta de los síntomas, en comparación con un vertebrado no inmunizado.

Se proporciona un método para inducir inmunidad sustancial a la infección por el virus del VRS o al menos un síntoma de la enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del VRS, una micela F del VRS que comprende una proteína F modificada o mutada del VRS, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. También se proporciona un método para vacunar a un mamífero contra el VSR que comprende administrar al mamífero una cantidad inductora de protección de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o proteína del RSV. En un ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprende adicionalmente una proteína M del RSV, tal como proteína M del BRSV. En otro ejemplo, el método comprende adicionalmente administrar VLP que comprenden proteína G del RSV, por ejemplo, una proteína G del HRSV. En otro ejemplo, el método comprende adicionalmente administrar VLP que comprenden proteína

N del grupo A del HRSV. En otro ejemplo, el método comprende adicionalmente administrar VLP que comprenden proteína N del grupo B del HRSV. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden proteína M quimérica del BRSV y proteína F y/o G obtenida del RSV, donde las proteínas F y/o G están fusionadas a la cola transmembrana y citoplasmática de la proteína M. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden proteína M del BRSV y proteína F y/o G quimérica del RSV donde la proteína F y/o G está fusionada al dominio transmembrana y a cola citoplasmática de la proteína HA y/o NA de la gripe. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden proteína M de BRSV y proteína F y/o G quimérica del RSV y opcionalmente una proteína HA y/o NA de la gripe, donde la proteína F y/o G está fusionada al dominio transmembrana y a cola citoplasmática de la proteína HA. En otro ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden proteína M del BRSV y proteína F y/o G quimérica del RSV, y opcionalmente una proteína HA y/o NA de la gripe, donde la proteína HA y/o NA está fusionada al dominio transmembrana y a cola citoplasmática de la proteína F y/o G del RSV.

Se proporciona un método de inducción de inmunidad sustancial contra una infección, o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, causada por un agente infeccioso, que comprende administrar al menos una dosis eficaz de la proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV.

En un ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente una proteína M del RSV, tal como proteína M de BRSV, y al menos una proteína de otro agente infeccioso. En un ejemplo, el método comprende administrar VLP que comprenden adicionalmente una proteína M de BRSV y al menos una proteína del mismo agente infeccioso o uno heterólogo. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso es una proteína vírica. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso es una proteína asociada con envuelta. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso se expresa sobre la superficie de VLP. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso comprende un epítipo que generará una respuesta inmunitaria protectora en un vertebrado. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso puede asociarse con la proteína M del RSV. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso puede asociarse con la proteína M de BRSV. En otro ejemplo, la proteína del agente infeccioso está fusionada a una proteína del RSV. En otro ejemplo, solamente una parte de una proteína del agente infeccioso está fusionada a una proteína del RSV. En otro ejemplo, solamente una parte de una proteína del agente infeccioso está fusionada a una parte de una proteína del RSV. En otro ejemplo, la parte de la proteína del agente infeccioso fusionada a la proteína del RSV se expresa sobre la superficie de VLP. En otro ejemplo, la proteína del RSV o parte de la misma, fusionada a la proteína del agente infeccioso se asocia con la proteína M del RSV. En otro ejemplo, la proteína del RSV, o parte de la misma, fusionada a la proteína del agente infeccioso se asocia con la proteína M de BRSV. En otro ejemplo, la proteína del RSV, o parte de la misma, se obtiene de la proteína F, G, N y/o P del RSV. En otro ejemplo, las VLP comprenden adicionalmente la proteína N y/o P del RSV. En otro ejemplo las VLP comprenden más de una proteína del agente infeccioso. En otro ejemplo la VLP comprenden más de una proteína del agente infeccioso, creando de este modo una VLP multivalente.

Se proporciona un método para inducir una respuesta de anticuerpos protectores a una infección o al menos un síntoma de la misma en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del RSV, una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV, o una VLP que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV como se describió anteriormente.

Como se usa en este documento, un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes e inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas.

Se proporciona un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una proteína F modificada o mutada del RSV. También se proporciona un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una micela F del RSV que comprende una proteína F modificada o mutada del RSV. También se proporciona un método para inducir una respuesta celular protectora a la infección por RSV o al menos un síntoma de enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una VLP, en el que la VLP comprende una proteína F modificada o mutada del RSV como se describió anteriormente. La inmunidad mediada por células también desempeña un papel en la recuperación a partir de una infección por RSV y puede prevenir las complicaciones asociadas con RSV. Se han detectado linfocitos celulares específicos del RSV en la sangre y las secreciones del tracto respiratorio inferior de sujetos infectados. La citólisis de células infectadas por RSV está mediada por CTL en concierto con anticuerpos específicos del RSV y el complemento. La respuesta citotóxica principal es detectable en

sangre después de 6-14 días y desaparecen el día 21 en individuos infectados o vacunados (Ennis *et al.*, 1981). La inmunidad mediada por células también desempeña un papel en la recuperación a partir de una infección por RSV y puede prevenir las complicaciones asociadas con RSV. Se han detectado linfocitos celulares específicos del RSV en la sangre y secreciones de tracto respiratorio inferior de sujetos infectados.

- 5 Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones inmunogénicas de la invención previenen o reducen al menos un síntoma de infección por RSV en un sujeto. Los síntomas del RSV son muy conocidos en la técnica. Incluyen rinorrea, dolor de garganta, cefalea, ronquera, tos, esputo, fiebre, estertores, sibilancias, y disnea. Por tanto, el método divulgado comprende la prevención o reducción de al menos un síntoma asociado con infección por RSV. Una reducción en un síntoma puede determinarse de forma subjetiva u objetiva, por ejemplo, autoevaluación por un
- 10 sujeto, por una evaluación del médico o realizando un ensayo o medición apropiada (por ejemplo, temperatura corporal) incluyendo, por ejemplo, una evaluación de calidad de vida, una progresión ralentizada de una infección por RSV o síntomas adicionales, una gravedad reducida de los síntomas del RSV o un ensayo adecuado (por ejemplo, título de anticuerpo y/o ensayo de activación de células T). La evaluación objetiva comprende evaluaciones tanto en animales como en seres humanos.
- 15 Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de bácmidos recombinantes, transfección de células de insecto para preparar soluciones madre de virus recombinante, purificación en placa, e infección de células de insecto con solución madre de virus primario.

- 20 Para construir virus recombinante, se optimizaron los codones de los genes víricos de interés para la expresión en células de insecto Sf9 y se clonaron en vectores pFastBac™.

- Una vez se confirmaron las construcciones deseadas y se purificaron, se descongeló en hielo un vial de células competentes MAX Efficiency® DH10Bac™ para cada construcción. Se añadió aproximadamente 1 ng (5 µl) del ADN plasmídico de la construcción pFastBac™ deseada a las células y se mezcló suavemente. Las células se incubaron
- 25 en hielo durante 30 minutos. Esto estuvo seguido por choque térmico de las células durante 45 segundos a 42 °C sin agitación. A continuación, los tubos se transfirieron a hielo y se enfriaron durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente a cada tubo. Los tubos se pusieron en un agitador a 37 °C a 225 rpm durante 4 horas. Para cada transformación pFastBac™, se prepararon diluciones en serie de factor 10 de las células (10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³) usando medio S.O.C. A continuación, se sembraron en placa 100 µl de cada dilución
- 30 en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de canamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, 100 µg/ml de Bluo-gal, y 40 µg/ml de IPTG. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Se picaron las colonias blancas para el análisis.

Se prepararon diferentes ADN de bácmido a partir de lo anterior para cada construcción y se aislaron. Estos ADN se precipitaron y añadieron a células Sf9 durante 5 horas.

- 35 A continuación, se infectaron 30 ml de células de insecto Sf9 (2 x 10⁶ células/ml) con baculovirus que expresaba proteínas víricas de interés con 0,3 ml de eluato de placa y se incubaron durante 48-72 horas. Se reservó aproximadamente 1 ml de cultivo en bruto (células + medio) y recolecciones de cultivo aclarado para análisis de expresión y el resto se reservó con propósitos de purificación.

Ejemplo 2

- 40 Expresión, purificación, y análisis de proteínas F modificadas de HRSV

Se sintetizaron genes que codificaban proteínas F modificadas de HRSV de interés *in vitro* como oligonucleótidos solapantes, se clonaron y expresaron en células hospedadoras. La clonación y expresión de los genes F modificados del RSV se consiguieron siguiendo los métodos conocidos en la técnica.

- Se picaron las placas recombinantes que contenían proteínas víricas de interés y se confirmaron. El virus recombinante después se amplificó por infección de células de insecto Sf9. En algunos casos, se co-infectaron células de insecto Sf9 por un virus recombinante que expresaba proteína F modificada y otro virus recombinante que expresaba otras proteínas víricas (por ejemplo, proteína M de BRSV y/o proteína N de HRSV). Se infectó un cultivo de células de insecto a ~3 MOI (multiplicidad de infección = ffu o pfu/célula de virus) con baculovirus que portaba las diversas construcciones. El cultivo y el sobrenadante se recogieron 48-72 horas postinfección. La recolección en bruto,
- 45 aproximadamente 30 ml, se aclaró por centrifugación durante 15 minutos a aproximadamente 800 x g. Las recolecciones celulares en bruto resultantes que contenían proteína F modificada de HRSV se purificaron como se describe a continuación.

Se purificaron proteínas F modificadas de HRSV de interés a partir de las recolecciones de cultivo celular de insecto Sf9 infectado. Se usó tensioactivo no iónico Tergitol® NP-9 (Etoxilato de Nonilfenol) para un protocolo de extracción

de proteínas de membrana. La extracción en bruto se purificó adicionalmente por pase a través de una cromatografía de intercambio aniónico, afinidad por lectina de lenteja/HIC, y cromatografía de intercambio catiónico.

La expresión de proteínas se analizó por SDS-PAGE y se tiñó para las proteínas totales por tinción de Coomassie. Se cargaron volúmenes iguales de muestras celulares a partir de la recolección en bruto y tampón de muestra 2x que contenía β ME (beta-mercaptoetanol), aproximadamente 15 a 20 μ l (aproximadamente de 7,5 a 10 μ l del cultivo)/carril, en un gel de SDS Laemmli.

En algunos casos, en lugar de cromatografía, las proteínas F modificadas de HRSV en las recolecciones celulares en bruto se concentraron por un método de separación en gradiente de sacarosa al 30 %, y después se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie, o transferencia de Western usando anticuerpo monoclonal anti-F del RSV.

La recolección celular en bruto que contenía proteínas F recombinantes modificadas, proteínas F recombinantes purificadas, o proteínas F recombinantes concentradas por gradiente de sacarosa puede analizarse adicionalmente por transferencia de Western usando anticuerpo monoclonal anti-F del RSV y/o anticuerpo policlonal anti-F del RSV.

Ejemplo 3

Gen de F modificado de HRSV que codifica la proteína F BV n.º 541

Los intentos iniciales por expresar la proteína F de longitud completa de HRSV demostraron ser insatisfactorios en conseguir altos niveles de expresión. La secuencia del gen de F usada en la expresión fue la SEQ ID NO: 1 (gen de F de tipo silvestre de HRSV, N.º de acceso a GenBank M11486). Codifica un precursor inactivo (Fo) de 574 aa. Este precursor se escinde dos veces por proteasas tipo furina durante la maduración para producir dos polipéptidos unidos por disulfuro, la subunidad F2 desde el extremo N-terminal y F1 desde el extremo C-terminal (Figura 1). Los dos sitios de escisión son en los restos 109 y 136, que están precedidos por motivos de reconocimiento de furina (RARR, aa 106-109 (SEQ ID NO: 23) y KKRKRR, aa 131-136 (SEQ ID NO: 24)). La secuencia del gen de F de la SEQ ID NO: 1 contiene un uso sub-óptimo de codones para la expresión en células de insecto Sf9 y alberga tres errores, que producen una proteína que puede mostrar plegamiento menor del óptimo (SEQ ID NO: 2, N.º de acceso a GenBank AAB59858). Además, se identificó un posible sitio de poli(A) adenilación (ATAAAA) en la región que codifica la subunidad F2. Además, la secuencia génica de F de tipo silvestre es aproximadamente un 65 % rica en AT, mientras que la relación deseada de GT-AT de una secuencia génica en un sistema de expresión de células de insecto Sf9 es aproximadamente 1:1.

En un intento por superar los malos niveles de expresión de la proteína F de HRSV, se diseñó una nueva secuencia génica de F de modo que:

- (a) se corrigieran los tres errores de secuenciación de GenBank;
- (b) se modificara el sitio críptico de poli(A) en la región que codifica la subunidad de F2;
- (c) se optimizaran los codones para el gen de F; y
- (d) el gen de F codifique una proteína F modificada con sitio de escisión primario inactivado.

Los tres errores de aminoácido corregidos fueron P102A, I379V, y M447V. El sitio críptico de poli(A) en el gen de F de HRSV se corrigió sin cambiar la secuencia de aminoácidos.

El esquema de optimización de codones se basó en los siguientes criterios: (1) abundancia de aminoacil-ARNt para un codón particular en especies de lepidópteros de células de insecto para un aminoácido dado como se describe por Levin, D.B. et al. (Journal of General Virology, 2000, vol. 81, pág. 2313-2325), (2) mantenimiento de la relación GC-AT en secuencias génicas a aproximadamente 1:1, (3) introducción mínima de estructuras de ADN palindrómicas o de tronco-lazo, y (4) introducción mínima de secuencias de elementos represores de la transcripción y posttranscripción. Se mostró un ejemplo de secuencia génica de F optimizada como la SEQ ID NO: 19 (F del RSVBV n.º 368).

Para inactivar el sitio de escisión primario (1º CS, KKRKRR, aa 131-136) de la proteína F de HRSV, se mutó el sitio de reconocimiento de furina KKQKQQ (SEQ ID NO: 28) o GRRQQR (SEQ ID NO: 29). Se evaluaron varias proteínas F modificadas con dichas mutaciones en el sitio de escisión para determinar la eficacia de la prevención de escisión. La Figura 2 muestra varias de las proteínas F modificadas que se evaluaron. Los resultados indican que el sitio de escisión primario de la proteína F de HRSV puede inactivarse por tres cambios conservativos de aminoácido, R133Q, R135Q, y R136Q. estos cambios conservativos de aminoácido de arginina (R) que es una molécula cargada polar, a glutamina (Q) que es una molécula neutra polar, alteró el estado de carga en estos sitios y evitó la escisión por proteasas de tipo furina (véase la Figura 3), conservando aún al mismo tiempo la estructura 3D de la proteína F. La prevención de la escisión en el 1º CS provocó actividad reducida de fusión con la membrana de la proteína F.

Una secuencia génica de ejemplo no limitante de F modificada de HRSV diseñada para tener todas las modificaciones mencionadas anteriormente se muestra en la Figura 4. Este gen F modificado (SEQ ID NO: 5, F del RSVBV n.º 541) codifica una proteína F modificada de la SEQ ID NO: 6. La secuencia génica se sintetizó *in vitro* como oligonucleótidos

solapantes, clonados y expresados en células hospedadoras. Se purificó la proteína F modificada de HRSV BV n.º 541 a partir de las recolecciones de cultivo celular de insecto Sf9 infectado, y se analizó por SDS- PAGE teñido por Coomassie. En el Ejemplo 2 se describe el método de purificación y el análisis de SDS-PAGE. El nivel de expresión de la proteína F del RSVBV n.º 541 (por ejemplo, proteína F 541) se mejoró en comparación con la proteína F0 de tipo silvestre en células de insecto Sf9.

Ejemplo 4

Proteína F modificada de HRSV con delección parcial del dominio de fusión de la subunidad F1

Para mejorar adicionalmente la expresión de la proteína F del RSV, se diseñaron genes de F adicionalmente modificados de HRSV que comprendían las siguientes modificaciones:

- (a) se corrigieron los tres errores de secuenciación de GenBank;
- (b) se modificó el sitio críptico poli(A) en la región que codifica la subunidad de F2;
- (c) se optimizaron los codones para el gen de F; y
- (d) las secuencias de nucleótidos que codifican el dominio de fusión de la subunidad F1 se deleccionaron parcialmente. En un experimento, se deleccionó la secuencia de nucleótidos que codifica los primeros 10 aminoácidos del dominio de fusión de la subunidad F1 (correspondiente a los aminoácidos 137-146 de la SEQ ID NO: 2).

Se muestra un gen de F modificado del RSV de ejemplo no limitante que comprende dichas modificaciones en la Figura 5, denominado SEQ ID NO: 9 (F del RSVBV n.º 622, por ejemplo, proteína F 622), que codifica una proteína F modificada de la SEQ ID NO: 10. La proteína F modificada de HRSV BV n.º 622 se purificó a partir de las recolecciones de cultivo celular de insecto Sf9 infectado, y se analizó por SDS-PAGE teñido con Coomassie. El método de purificación y análisis de SDS-PAGE se describe en el Ejemplo 2. Se observaron altos niveles de expresión de proteína F de HRSV BV n.º 622, como se presenta en la SDS-PAGE en la Figura 6.

Ejemplo 5

Proteína F modificada de HRSV con sitio de escisión primario inactivado y también delección parcial del dominio de fusión F1

Para determinar si la combinación de sitio de escisión primario inactivado y delección parcial del dominio de fusión F1 puede promover adicionalmente la expresión de la proteína F del RSV, particularmente en las células de insecto Sf9, se diseñó otro gen de F modificado del RSV que comprende las siguientes modificaciones:

- (a) se corrigieron los tres errores de secuenciación de GenBank;
- (b) se modificó el sitio críptico poli(A) en la región que codifica la subunidad de F2;
- (c) se optimizaron los codones para el gen de F; y
- (d) se inactivó el sitio de escisión primario; y
- (e) la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de fusión de la subunidad F1 se deleccionó parcialmente. En un experimento, se deleccionó la secuencia de nucleótidos que codifica los primeros 10 aminoácidos del dominio de fusión de la subunidad F1 (correspondiente a los aminoácidos 137-146 de la SEQ ID NO: 2).

Se muestra un gen de F del RSV modificado de ejemplo no limitante que comprende dichas modificaciones en la Figura 7, denominado SEQ ID NO: 7 (F del RSVBV n.º 683, por ejemplo, proteína F 683), que codifica la proteína F modificada de la SEQ ID NO: 8. La proteína F modificada del RSVBV n.º 683 (por ejemplo, proteína F 683) se purificó a partir de las recolecciones de cultivo celular de insecto Sf9 infectado y se analizó por SDS-PAGE teñido con Coomassie. El método de purificación y análisis de SDS-PAGE se describe en el Ejemplo 2. Se consiguieron potenciaciones adicionales en los niveles de expresión, como se presenta en la SDS-PAGE en la Figura 8.

Ejemplo 6

Expresión y purificación de proteína F modificada de HRSV BV n.º 683

Se expresó la proteína F modificada de HRSV BV n.º 683 (por ejemplo, proteína F 683, SEQ ID NO: 8) en sistema de expresión de baculovirus como se describe en el Ejemplo 1, y se picaron placas recombinantes que expresaban la proteína F de HRSV BV n.º 683 y se confirmaron. El virus recombinante después se amplificó por infección de células de insecto Sf9. Se infectó un cultivo de células de insecto a ~3 MOI (multiplicidad de infección = ffu o pfu/célula de virus) con baculovirus. El cultivo y el sobrenadante se recogieron 48-72 horas postinfección. La recolección en bruto, aproximadamente 30 ml, se aclaró por centrifugación durante 15 minutos a aproximadamente 800 x g. Las recolecciones celulares en bruto resultantes que contenían la proteína F de HRSV BV n.º 683 se purificaron como se

describe a continuación.

La proteína F de HRSV BV n.º 683 se purificó a partir de las recolecciones de cultivo celular de insecto Sf9 infectado. Se usó el tensioactivo no iónico Tergitol® NP-9 (Etoxilato de Nonilfenol) para un protocolo de extracción de proteínas de membrana. La extracción en bruto se purificó adicionalmente por pase a través de una cromatografía de intercambio aniónico, afinidad por lectina de lenteja/HIC, y cromatografía de intercambio catiónico.

Se analizó la proteína F purificada de HRSV BV n.º 683 por SDS-PAGE teñido con Coomassie, y transferencia de Western usando anticuerpo monoclonal anti-F del RSV como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 9. Se consiguieron excelentes niveles de expresión de la proteína F de HRSV BV n.º 683 (por ejemplo, proteína F 683, SEQ ID NO: 8). Se estimó que el nivel de expresión estaba por encima de 10 mg/l en cultivo celular en bruto, y la proteína F recuperada BV n.º 683 fue de aproximadamente 3,5 mg/l de cultivo celular. En algunos casos, se consiguieron niveles de expresión por encima de 20 mg/l y se recuperaron aproximadamente 5 mg/l de proteína F modificada BV n.º 683 (véase la Figura 10). La pureza de la proteína F recuperada BV n.º 683 alcanzó por encima del 98 % como se determina por densitometría de exploración (véase la Figura 10).

Ejemplo 7

15 Micelas (rosetas) de proteína F purificada del HRSV BV n.º 683

Se analizó la proteína F purificada del HRSV BV n.º 683 por microscopia electrónica con tinción negativa (véase la Figura 11). Las proteínas F se agregaron en forma de micelas (rosetas), similares a las observadas para la proteína F de tipo silvestre del HRSV (Calder et al., 2000, Virology 271, pág. 122-131), y otras glucoproteínas de membrana víricas de longitud completa (Wrigley et al., Academic Press, Londres, 1986, vol. 5, pág. 103-163). Bajo el microscopio electrónico, las espigas de F mostraron morfología de varilla con forma de piruleta con sus extremos más anchos proyectándose desde los centros de las rosetas. La longitud del único trímero fue de aproximadamente 20 nm, y el diámetro de la partícula de micela fue de aproximadamente 40 nm (véase la Figura 12). Estos resultados indicaron que la proteína F de HRSV BV n.º 683 ha corregido la estructura 3D para una proteína activa nativa.

En resumen, se ha diseñado, expresado, y purificado una proteína F de HRSV recombinante modificada (por ejemplo, BV n.º 683). Esta proteína F de longitud completa modificada está glucosilada. Las modificaciones del sitio de escisión primario y el dominio de fusión en conjunto potenciaron enormemente el nivel de expresión de proteína F. Además, esta proteína F modificada puede escindirse en las subunidades F1 y F2, que están unidas por disulfuro.

Los trímeros de las subunidades F1 y F2 forman espigas con forma de piruleta de 19,6 nm y partículas de 40,2 nm. Además, esta proteína F modificada se expresa a alto nivel en células de insecto Sf9. Se consiguió pureza de las micelas >98 % después de la purificación. El hecho de que las espigas de esta proteína modificada tuvieran una morfología de piruleta, que puede formar adicionalmente partículas de micelas de 40 nm, indica que la proteína F modificada BV n.º 683 tiene una estructura 3D correcta de una proteína nativa.

Ejemplo 8

35 Co-expresión de la proteína F modificada de HRSV con proteína M de BRSV y/o proteína N de HRSV en la producción de VLP

La presente divulgación también proporciona VLP que comprenden una proteína F modificada o mutada del RSV. Dichas VLP son útiles para inducir anticuerpos neutralizantes contra antígenos proteicos víricos y por tanto pueden administrarse para establecer inmunidad contra RSV. Por ejemplo, dichas VLP pueden comprender una proteína F modificada del RSV, y proteínas M de BRSV y/o N de HRSV. Los codones de los genes que codifican proteína M de BRSV (SEQ ID NO: 14) o N de HRSV (SEQ ID NO: 18) pueden optimizarse para la expresión en células de insecto. Por ejemplo, se muestra una secuencia génica de M de BRSV optimizada en la SEQ ID NO: 13 y se muestra una secuencia génica de N del RSV optimizada en la SEQ ID NO: 17.

En un experimento, se expresaron en solitario una proteína F modificada BV n.º 622 y otra proteína F modificada BV n.º 623 (SEQ ID NO: 21, modificada de modo que estén inactivos ambos sitios de escisión), o se co-expresaron con la proteína N de HRSV y la proteína M de BRSV. Ambas recolecciones celulares en bruto que contenían VLP (intracelulares) y sedimentos de VLP recogidos de la separación en gradiente de sacarosa al 30 % se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie, y transferencia de Western usando anticuerpo monoclonal anti-F del RSV. La Figura 13 muestra la estructura de las proteínas F modificadas BV n.º 622 y BV n.º 623, y los resultados de SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western. BV n.º 622 se expresaba a alto nivel por sí misma o se co-expresaba con la proteína N de HRSV y la proteína M de BRSV, mientras que BV n.º 623 tenía muy mala expresión, lo que indica que la inactivación de ambos sitios de escisión inhibe la expresión de la proteína F.

En otro experimento, se expresaron en solitario la proteína F modificada BV n.º 622, el gen en tándem doble BV n.º 636 (BV n.º 541 + M de BRSV), BV n.º 683, BV n.º 684 (BV n.º 541 con el dominio L de YIAL introducido en el extremo C-terminal), y BV n.º 685 (BV n.º 541 con el dominio L de YKKL introducido en el extremo C-terminal) o se co-expresaron con la proteína N de HRSV y la proteína M de BRSV. El dominio L (dominio tardío) es una secuencia conservada en retrovirus, y se presenta dentro de Gag que actúa junto con proteínas celulares para liberar de forma

eficaz viriones de la superficie de la célula (Ott et al., 2005, Journal of Virology 79: 9038-9045). La estructura de cada proteína F modificada se muestra en la Figura 14. Ambas recolecciones celulares en bruto que contenían VLP (intracelulares) y sedimentos de VLP recogidos de la separación en gradiente de sacarosa al 30 % se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie, y transferencia de Western usando anticuerpo monoclonal anti-F del RSV. La Figura 14 muestra los resultados de SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western de recolecciones celulares en bruto que contenían VLP (intracelulares), y la Figura 15 mostró los resultados de SDS-PAGE y el análisis de transferencia de Western de sedimentos de VLP recogidos de la separación en gradiente de sacarosa al 30 %. BV n.º 622 y BV n.º 683 se expresaron a alto nivel por sí mismas o se co-expresaron con la proteína N del HRSV y la proteína M del BRSV, mientras que BV n.º 636, BV n.º 684, y BV n.º 685 tuvieron mala expresión.

Ejemplo 9

Detección de proteínas F quiméricas de HRSV con alta expresión

Se hicieron esfuerzos por detectar proteínas F adicionales del RSV que pudieran expresarse en alto nivel en forma soluble en células de insecto y puedan formar VLP con mejor rendimiento. Se diseñaron diversos genes de F, se expresaron y analizaron. Se usaron tanto transferencia de Western como SDS-PAGE para evaluar la expresión.

La Figura 16a a Figura 16d resumen la estructura, nombre del clon, descripción, resultados de transferencia de Western/análisis de Coomassie y conclusión para cada clon de F quimérico de HRSV.

Como indicaron los resultados, la proteína F de longitud completa de tipo silvestre se expresaba poco; las proteínas F quiméricas de HRSV que contenían la subunidad F1 pero no F2 podían expresarse bien, pero los productos eran insolubles, lo que podía deberse a mal plegamiento, o no podían ensamblarse con otras proteínas víricas para formar VLP con buen rendimiento después de co-infecciones. La inactivación del sitio de escisión primario en solitario no produjo aumentos sustanciales en la expresión, pero se consiguió una mejor expresión cuando la inactivación del sitio de escisión primario se combinaba con otra modificación tal como delección del sitio críptico poli (A) y corrección de los errores de aa de GenBank (por ejemplo, BV n.º 541). La introducción del dominio L de YKKL en el extremo C-terminal de BV n.º 541 potenció la secreción de VLP que contenían proteína F modificada en aproximadamente 2-3 veces en co-expresión con proteínas M de BRSV y N de HRSV. Los resultados demostraron adicionalmente que un gen quimérico en tándem doble que consistía en el gen BV n.º 541 y el gen de M de BRSV presentaba tanto rendimiento intracelular como de VLP mejorado en comparación con co-infección de BV n.º 541 y proteínas M de BRSV, lo que indica que la proteína M de BRSV puede facilitar la producción de VLP que contienen proteína F modificada de HRSV en células de insecto cuando se expresan en tándem. Un gen quimérico en tándem triple que consiste en BV n.º 541, M de BRSV, y N de HRSV tuvieron rendimiento intracelular incluso mayor y de VLP mucho mejor en comparación con el gen quimérico en tándem doble mencionado anteriormente o co-infección de BV n.º 541, proteínas M de BRSV y N de HRSV. Además, los resultados sugirieron que la proteína F quimérica de HRSV BV n.º 683 (por ejemplo, proteína F 683, SEQ ID NO: 8) tuvo la mejor expresión intracelular. La expresión de un gen quimérico en tándem doble que consistía en BV n.º 683 y genes de M de BRSV, o un gen quimérico en tándem triple que consistía en BV n.º 683, genes de M de BRSV, y N de HRSV también está incorporada en este documento. Estos genes quiméricos en tándems dobles y triples deben mejorar adicionalmente la producción de VLP en comparación con co-infección.

Ejemplo 10

Ensayo de neutralización del RSV y estudios de exposición a RSV en ratones

Para ensayar la eficacia de una vacuna que comprende proteína F modificada de HRSV BV n.º 683 en impedir la infección por HRSV, se realizó un ensayo de neutralización y estudios de exposición a RSV en ratones. Los procedimientos experimentales se muestran en la Figura 17.

Se inyectó a grupos de ratones (n=10) por vía intramuscular (excepto para RSV vivo) con placebo (solución de PBS), RSV vivo (dado por vía intranasal), vacuna del RSV inactivada con formalina (FI-RSV), 1 ug de partículas F purificadas ((PFP, proteína F modificada BV n.º 683), 1 ug de partículas F purificadas con Alumbre (PFP + Alumbre), 10 ug de partículas F purificadas, 10 ug de partículas F purificadas con Alumbre (PFP + Alumbre), o 30 ug de partículas F purificadas en el día 0 y el día 21. Cada grupo inmunizado se expuso a RSV vivo en el día 42 (21 días después de la segunda inmunización). Se recogió suero de ratón de cada grupo en el día 0, el día 31 (10 días después de la segunda inmunización), y el día 46 (4 días después de la exposición con RSV vivo).

Se ensayó el suero de ratón para cada grupo de tratamiento para la presencia de anticuerpos neutralizantes anti- RSV. Se incubaron diluciones de suero de ratones inmunizados con RSV infeccioso en placas de microtitulación de 96 pocillos. El suero se diluyó de 1:20 a 1:2560. Se mezclaron 50 ul de suero diluido con 50 ul de virus RSV vivo (400 pfu) en cada pocillo. La mezcla de virus/suero se incubó primero durante 60 minutos a temperatura ambiente, y después se mezcló con 100 ul de células HEP-2 y se incubaron durante 4 días. La cantidad de placas de virus infeccioso se contó entonces después de teñirse con violeta cristal. El título de neutralización para cada muestra de suero se definió como la inversa de la dilución más alta de suero que producía un 100 % de neutralización del RSV (por ejemplo, sin placas) y se determinó para cada animal. La media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes en suero en el día 31 (10 días después del refuerzo) y el día 46 (4 días después de la exposición con RSV vivo) se representaron en gráfico para cada grupo de vacuna. La Figura 18 muestra los resultados de ensayos de

neutralización. Los resultados indican que 10 ug o 30 ug de proteína F purificada producen un título de neutralización mucho mayor en comparación con RSV vivo. Además, los títulos de neutralización de PFP se potencian con coadministración de adyuvante Alumbre.

Se realizaron estudios de exposición a RSV para determinar si la inmunización podía prevenir y/o inhibir la replicación del RSV en los pulmones de animales inmunizados. Se determinó la cantidad del RSV en los pulmones de ratones inmunizados por ensayo de placa usando células HEp-2. Se infectaron grupos inmunizados de ratones mencionados anteriormente con 1×10^6 pfu de la cepa larga del RSV infecciosa por vía intranasal en el día 42 (11 días después de la segunda inmunización). En el día 46 (4 días después de la infección con RSV), se retiraron los pulmones de los ratones, se pesaron, y se homogeneizaron. Se aclaró el tejido de pulmón homogeneizado. El sobrenadante de la solución aclarada se diluyó y se sometió a ensayo de placa usando células HEp-2 para determinar el título del RSV en tejido pulmonar (calculado como puf/g de tejido pulmonar). Los resultados se muestran en la Figura 19, que indican que todos los ratones inmunizados con proteína F recombinante del RSVBV n.º 683 obtuvieron RSV indetectable en los pulmones, e incluso 1 ug de proteína F recombinante purificada de HRSV BV n.º 683 sin adyuvante mostró excelente eficacia en la inhibición de la replicación del RSV (reducida más de 1000 veces en comparación con el placebo).

Para determinar la estabilidad de la vacuna del RSVFPF usada anteriormente, la vacuna se almacenó a 2-8 °C durante 0, 1, 2, 4, y 5 semanas, y después se analizó por SDS-PAGE teñida con Coomassie (Figura 20). Los resultados muestran que esta vacuna del RSVFPF es muy estable a 2-8 °C y no existe degradación detectable.

Ejemplo 11

Actividad de micela F recombinante del RSV en ratas del algodón

En este ejemplo, los grupos de animales incluían inmunización en los días 0 y 21 con RSV vivo (RSV), RSV inactivado con formalina (FI-RSV), proteína F del RSVBV n.º 683 con y sin aluminio (PFP y PFP + adyuvante de aluminio), y controles de PBS.

Como se muestra en la Figura 21, la inmunización con 30 ug de vacuna de micela F (proteína F del RSVBV n.º 683, es decir proteína F 683, SEQ ID NO: 8), con y sin aluminio produjo robustas respuestas de anticuerpos neutralizantes después de exposición a RSV A y RSV B. Además, se observó que el aluminio potencia significativamente la respuesta de anticuerpos. Además, se aumentaron los anticuerpos neutralizantes después de un refuerzo en el día 46 o día 49 en RSV A y RSV B, respectivamente.

Aunque se observó patología pulmonar significativa en ratas inmunizadas con RSV inactivado con formalina (FI-RSV), no se observó potenciación de la enfermedad con la vacuna de micela F (Figura 22). El uso de la vacuna de micela F y la vacuna de micela F con adyuvante produjo valores de inflamación inferiores (4,0 y 2,8 respectivamente) que la infección primaria por RSV (exposición a PBS + RSV) del grupo de control (5,8). Como se ha indicado anteriormente, el grupo tratado con FI-RSV obtuvo un valor de inflamación más alto que la infección primaria por RSV (exposición a PBS + RSV) del grupo de control (9,0 frente a 5,8). Además, el grupo tratado con FI-RSV obtuvo un valor medio de inflamación significativamente más alto (9,0) que los controles de placebo no expuestos, exposición a RSV vivo + RSV, exposición a micela F + RSV, y exposición a micela F + aluminio + RSV.

La descripción detallada anteriormente se ha dado por motivos de claridad de comprensión y las modificaciones serán obvias para los expertos en la materia. No es una admisión de que cualquier información proporcionada en este documento es técnica anterior o relevante para las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación específica o implícitamente referenciada es técnica anterior.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención.

Aunque la solicitud se ha descompuesto en secciones para dirigir la atención del lector a realizaciones específicas, dichas secciones no deben entenderse como una división entre las realizaciones. Los contenidos de cada sección y las realizaciones descritas en las mismas son aplicables a otras secciones.

Listados de secuencias

<110> Novavax, Inc.

<120> Proteínas F del RSV Modificadas y Métodos de su Uso

<130> NOV-034/03EP 305047-2460

<150> US 61/121,126

<151> 2008-12-09

<150> US 61/169,077

<151> 2009-04-14

<150> US 61/224,787

<151> 2009-07-10

<160> 29

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1725

<212> ADN

<213> Virus sincitial respiratorio

10 <400> 1

atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt	60
tgttttgctt ctggtcaaaa catcactgaa gaattttatc aatcaacatg cagtgcagtt	120
agcaaaggct atccttagtgc tctgagaact ggttggtata ccagtgttat aactatagaa	180
ttaagtaata tcaaggaaaa taagtgtaat ggaacagatg ctaaggtaaa attgataaaa	240
caagaattag ataaatataa aatgctgta acagaattgc agttgctcat gcaaagcaca	300
ccaccaacaa acaatcgagc cagaagagaa ctaccaaggt ttatgaatta taaactcaac	360
aatgccaaaa aaaccaatgt aacattaagc aagaaaagga aaagaagatt tcttggtttt	420
ttgttaggtg ttggatctgc aatcgccagt ggcgttgctg tatctaaggt cctgcacctt	480
gaaggggaag tgaacaagat caaaagtgtc ctactatcca caaacaaggc ttagtgcagc	540
ttatcaaatg gagttagtgt cttaaccagc aaagtgttag acctcaaaaa ctatatagat	600
aaacaattgt tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agaaactgtg	660
atagagttcc aacaaaagaa caacagacta ctagagatta ccagggaatt tagtgtaaat	720
gcaggtgtaa ctacacctgt aagcacttac atgttaacta atagtgaatt attgtcatta	780
atcaatgata tgcctataac aatgatcag aaaaagttaa tgtccaacaa tgttcaaata	840
gtagacagc aaagttactc tatcatgtcc ataataaaag aggaagtctt agcatatgta	900
gtacaattac cactatatgg tggtatagat acaccctgtt ggaaactaca cacatcccct	960
ctatgtacaa ccaacacaaa agaagggtcc aacatctgtt taacaagaac tgacagagga	1020
tggtactgtg acaatgcagg atcagtatct ttcttccac aagctgaaac atgtaaagtt	1080

ES 2 796 725 T3

```

caatcaaadc gagtattttg tgacacaatg aacagtttaa cattaccaag tgaataaat      1140
ctctgcaatg ttgacatatt caaccccaaa tatgattgta aaattatgac ttcaaaaaca      1200
gatgtaagca gctccgttat cacatctcta ggagccattg tgatcatgcta tggcaaaact      1260
aaatgtacag catccaataa aaatcgtgga atcataaaga cattttctaa cgggtgcat      1320
tatgtatcaa ataaagggat ggacactgtg tctgtaggta acacattata ttatgtaa      1380
aagcaagaag gtaaaagtct ctatgtaaaa ggtgaaccaa taataaatct ctatgacca      1440
ttagtattcc cctctgatga atttgatgca tcaatatctc aagtcaacga gaagattaac      1500
cagagcctag catttattcg taaatccgat gaattattac ataatgtaaa tgctggtaaa      1560
tccaccacaa atatcatgat aactactata attatagtga ttatagtaat attgttatca      1620
ttaattgctg ttggactgct cttatactgt aaggccagaa gcacaccagt cacactaagc      1680
aaagatcaac tgagtggat aaataatatt gcatttagta actaa                        1725

```

<210> 2

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Virus sincitial respiratorio

<400> 2

```

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

```

ES 2 796 725 T3

130		135		140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu				
145		150		155
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
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
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

ES 2 796 725 T3

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	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> 3

<211> 1725

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 576

<400> 3

atggagctgc	tcatcttgaa	ggctaacgcc	attaccacta	tccttacagc	ggtgacgttc	60
tgctttgcat	ccggtcagaa	tattaccgaa	gagttctacc	aatctacttg	tagcgctgtc	120
tcaaaaggct	atctgtcggc	cctccgtaca	ggatgggtaca	cgagtgttat	caccatcgaa	180

ES 2 796 725 T3

```

ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgaac ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa      240
caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagtctacc      300
cccgtacga ataaccgcgc taggagagaa ctccacgat tcatgaacta tactctcaat      360
aacgcaaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcgta agcgaggtt tctgggcttc      420
ctcctgggag ttggttcagc tattgcgtcg ggcgtagccg tgagtaaagt ccttcacttg      480
gagggagaag ttaataagat caagtccgca ctctgtctca ctaacaaagc tgtggtcagc      540
ttgtcaaacg gtgtatccgt gctgacctcg aaggttcttg acctcaaaaa ttacatcgat      600
aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg      660
atcgagttcc aacagaaaaa caacagactc ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaaatt      720
gccggcggtta ctacccccgt ctccacgtac atgcttacaa actcggaatt gctcagtctg      780
attaacgaca tgcctatcac taatgatcag aagaagctta tgtctaacaa cgtgcaaatt      840
gtccgccagc aaagctattc catcatgtca atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta      900
gttcagctcc cactgtacgg agtcatcgac acccgtgctt ggaagcttca tacctgccc      960
tttgtgtacga caaatactaa agagggttct aacatttgcc tcaccaggac ggatcgaggc     1020
tggtattgcy ataacgctgg aagtgtgagc ttcttccctc aagcagaaac atgtaaggta     1080
cagtccaata gagttttttg cgacactatg aactcactga cccttccatc tgaggtcaat     1140
tttgtgaacg tcgatatctt caaccgaag tacgactgca aaattatgac gtccaagaca     1200
gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcactc ggtgccatcg tttcttgcta cggcaagacc     1260
aaatgtacgg cttccaataa gaaccgtgga attatcaaaa cattctcgaa cggttgagac     1320
tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg agtgtaggaa acaccctgta ctacgttaac     1380
aagcaagaag gtaaactact gtatgtcaag ggcgagccca ttatcaattt ttacgatcct     1440
cttgtgttcc catccgacga gttcgatgcy tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac     1500
cagtccttg g catttatccg caaatcggac gagctcctgc acaatgttaa cgccggaag     1560
agtacgacaa acattatgat cactaccatc attatcgtca ttatcgtgat cttttgtca     1620
ctcattgctg taggtctgct tttgtactgt aaagcgaggt ctacgcccgt tacactcagc     1680
aaggatcaac tgtccggcat caataacatt gccttctcga attaa                       1725

```

<210> 4

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 576

<400> 4

ES 2 796 725 T3

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	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	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	

ES 2 796 725 T3

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 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

ES 2 796 725 T3

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> 5

<211> 1725

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 541

<400> 5

atggagctgc tcatcttgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc	60
tgctttgcat cgggtcagaa tattaccgaa gagttctacc aatctacttg tagcgctgtc	120
tcaaaaggct atctgtcggc cctccgtaca ggatggtaca cgagtgttat caccatcgaa	180
ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgaac ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa	240
caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagtctacc	300
cccgtacga ataaccgctc taggagagaa cttccacgat tcatgaacta tactctcaat	360
aacgccaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcaga agcaacagtt tctgggcttc	420
ctcctgggag ttgggttcagc tattgcgtcg ggcgtagccg tgagtaaagt ccttcacttg	480
gagggagaag ttaataagat caagtcgcga ctctgtctta ctaacaaagc tgtggtcagc	540
ttgtcaaacg gtgtatccgt gctgacctcg aaggttcttg acctcaaaaa ttacatcgat	600
aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg	660
atcgagttcc aacagaaaaa caacagactc ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaa	720
gccggcggtta ctacccccgt ctccacgtac atgcttacaa actcggaatt gctcagtctg	780
attaacgaca tgcctatcac taatgatcag aagaagctta tgtctaacaa cgtgcaaatt	840
gtccgccagc aaagctattc catcatgtca atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta	900
gttcagctcc cactgtacgg agtcacgac acccgtgct ggaagcttca tacctcgccc	960
ttgtgtacga caaatactaa agagggttct aacatttgcc tcaccaggac ggatcgaggc	1020
tggtattgctg ataacgctgg aagtgtgagc ttcttcctc aagcagaaac atgtaaggta	1080

ES 2 796 725 T3

```

cagtcgaata gagttttttg cgacactatg aactcactga cccttccatc tgaggtcaat      1140
ttgtgtaacg tcgatatctt caacccgaag tacgactgca aaattatgac gtccaagaca      1200
gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcactc ggtgccatcg tttcttgcta cggcaagacc      1260
aaatgtacgg cttccaataa gaaccgtgga attatcaaaa cattctcgaa cggttgcgac      1320
tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg agtgtaggaa acaccctgta ctacgttaac      1380
aagcaagaag gtaaactcact gtatgtcaag ggcgagccca ttatcaatct ttacgatcct      1440
cttgtgttcc catccgacga gttcgatgcg tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac      1500
cagtccttgg catttatccg caaatcggac gagctcctgc acaatgttaa cgccggaaag      1560
agtcagacaa acattatgat cactaccatc attatcgtca ttatcgtgat ctttttgtca      1620
ctcattgctg taggtctgct tttgtactgt aaagcgaggt ctacgcccgt tacactcagc      1680
aaggatcaac tgtccggcat caataacatt gccttctcga attaa                      1725

```

<210> 6

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 541

<400> 6

```

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 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

```

ES 2 796 725 T3

Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Lys	Gln	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	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	Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val

ES 2 796 725 T3

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

<210> 7

<211> 1695

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 683

<400> 7

atggagctgc tcatcttgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc 60

tgctttgcat ccggtcagaa tattaccgaa gagttctacc aatctacttg tagcgcgtgc 120

ES 2 796 725 T3

tcaaaaggct atctgtcggc cctccgtaca ggatggtaca cgagtgttat caccatcgaa	180
ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgcacg ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa	240
caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagtctacc	300
cccgtacga ataaccgcgc taggagagaa cttccacgat tcatgaacta tactctcaat	360
aacgcaaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcaga agcaacaggc tattgcgtcg	420
ggcgtagccg tgagtaaagt ccttcacttg gagggagaag ttaataagat caagtccgca	480
ctcctgtcta ctaacaaagc tgtggtcagc ttgtcaaacg gtgtatccgt gctgacctcg	540
aaggttcttg acctcaaaaa ttacatcgat aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag	600
agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg atcgagttcc aacagaaaaa caacagactc	660
ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaaat gccggcgta ctacccccgt ctccacgtac	720
atgcttacaa actcggaatt gctcagtcgt attaacgaca tgcctatcac taatgatcag	780
aagaagctta tgtctaacaa cgtgcaaatt gtccgccagc aaagctattc catcatgtca	840
atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta gttcagctcc cactgtacgg agtcatcgac	900
accccgctgct ggaagcttca tacctcgccc ttgtgtacga caaatactaa agaggggtct	960
aacatttgcc tcaccaggac ggatcgaggc tggatttgcg ataacgctgg aagtgtgagc	1020
ttcttcctc aagcagaaac atgtaaggta cagtccaata gagttttttg cgacactatg	1080
aactcactga cccttccatc tgaggtaaat ttgtgtaacg tcgatatctt caaccogaag	1140
tacgactgca aaattatgac gtccaagaca gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcactc	1200
ggtgccatcg tttcttgcta cggcaagacc aaatgtacgg cttccaataa gaaccgtgga	1260
attatcaaaa cattctcgaa cggttgcgac tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg	1320
agtgtaggaa acaccctgta ctacgttaac aagcaagaag gtaaatcact gtatgtcaag	1380
ggcgagccca ttatcaatth ttacgatcct cttgtgttcc catccgacga gttcgatgcg	1440
tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac cagtccttgg catttatccg caaatcggac	1500
gagctcctgc acaatgttaa cgccggaaag agtacgacaa acattatgat cactaccatc	1560
attatcgtca ttatcgtgat ccttttgtca ctcattgctg taggtctgct tttgtactgt	1620
aaagcgaggt ctacgcccggt tacactcagc aaggatcaac tgtccggcat caataacatt	1680
gccttctcga attaa	1695

<210> 8

<211> 564

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 683

<400> 8

ES 2 796 725 T3

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	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	Gln	Lys	Gln	Gln	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	130	135	140	
Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	145	150	155	160
Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	165	170	175	
Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	180	185	190	
Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	195	200	205	
Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	210	215	220	
Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	225	230	235	240

ES 2 796 725 T3

Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	245	250	255
Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	260	265	270
Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	275	280	285
Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	290	295	300
Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	305	310	315
Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	325	330	335
Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	340	345	350
Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp	Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	355	360	365
Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val	Asp	Ile	Phe	Asn	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	370	375	380
Ile	Met	Thr	Ser	Lys	Thr	Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	385	390	395
Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Cys	Tyr	Gly	Lys	Thr	Lys	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn	405	410	415
Lys	Asn	Arg	Gly	Ile	Ile	Lys	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Cys	Asp	Tyr	Val	420	425	430
Ser	Asn	Lys	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Tyr	435	440	445
Val	Asn	Lys	Gln	Glu	Gly	Lys	Ser	Leu	Tyr	Val	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	450	455	460
Ile	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Pro	Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Ala	465	470	475
Ser	Ile	Ser	Gln	Val	Asn	Glu	Lys	Ile	Asn	Gln	Ser	Leu	Ala	Phe	Ile	485	490	495

ES 2 796 725 T3

Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr
500 505 510

Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu
515 520 525

Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser
530 535 540

Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile
545 550 555 560

Ala Phe Ser Asn

<210> 9

<211> 1695

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 622

<400> 9

atggagctgc tcatcttgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc	60
tgctttgcat cgggtcagaa tattaccgaa gagttctacc aatctacttg tagcgctgtc	120
tcaaaaggct atctgtcggc cctccgtaca ggatggtaca cgagtgttat caccatcgaa	180
ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgaac ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa	240
caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagtctacc	300
cccgcctacga ataaccgcgc taggagagaa cttccacgat tcatgaacta tactctcaat	360
aacgccaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcgta agcgcagggc tattgcgctcg	420
ggcgtagccg tgagtaaagt ccttcacttg gagggagaag ttaataagat caagtccgca	480
ctcctgtcta ctaacaaagc tgtggtcagc ttgtcaaacg gtgtatccgt gctgacctcg	540
aaggttcttg acctcaaaaa tcacatcgat aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag	600
agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg atcgagttcc aacagaaaaa caacagactc	660
ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaaata gccggcggtta ctacccccgt ctccacgtac	720
atgcttaciaa actcggaatt gctcagtcctg attaacgaca tgcctatcac taatgatcag	780
aagaagctta tgtctaaciaa cgtgcaaatt gtccgccagc aaagctattc catcatgtca	840
atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta gttcagctcc cactgtacgg agtcatcgac	900
accccgctgt ggaagcttca tacctcgccc ttgtgtacga caaataactaa agaggggttct	960
aacatttgcc tcaccaggac ggatcgaggc tggatttgcg ataacgctgg aagtgtgagc	1020

ES 2 796 725 T3

```

ttcttccctc aagcagaaac atgtaaggta cagtccaata gagttttttg cgacactatg      1080
aactcactga cccttccatc tgaggtcaat ttgtgtaacg tcgatatctt caaccogaag      1140
tacgactgca aaattatgac gtccaagaca gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcactc      1200
gggtccatcg tttcttgcta cggcaagacc aaatgtacgg cttccaataa gaaccgtgga      1260
attatcaaaa cattctcgaa cggttgcgac tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg      1320
agtgtaggaa acaccctgta ctacgttaac aagcaagaag gtaaatcact gtatgtcaag      1380
ggcgagccca ttatcaattt ttacgatcct cttgtgttcc catccgacga gttcgatgcg      1440
tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac cagtccttgg catttatccg caaatcggac      1500
gagctcctgc acaatgttaa cgccgaaag agtacgacaa acattatgat cactaccatc      1560
attatcgtca ttatcgtgat ccttttgtca ctcatgtctg taggtctgct tttgtactgt      1620
aaagcgaggt ctacgcccggt tacactcagc aaggatcaac tgtccggcat caataacatt      1680
gccttctcga attaa                                                    1695

```

<210> 10

<211> 564

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 622

<400> 10

```

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 Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
      100              105              110

```

ES 2 796 725 T3

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	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	130	135	140
Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	145	150	155
Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	165	170	175
Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	His	Ile	Asp	Lys	Gln	180	185	190
Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	195	200	205
Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	210	215	220
Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	225	230	235
Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	245	250	255
Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	260	265	270
Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	275	280	285
Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	290	295	300
Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	305	310	315
Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	325	330	335
Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	340	345	350
Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp	Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	355	360	365

ES 2 796 725 T3

Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys
370 375 380

Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu
385 390 395 400

Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn
405 410 415

Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val
420 425 430

Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr
435 440 445

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

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

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

Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr
500 505 510

Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu
515 520 525

Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser
530 535 540

Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile
545 550 555 560

Ala Phe Ser Asn

<210> 11

<211> 771

<212> ADN

5 <213> Virus sincitial respiratorio bovino

<400> 11

atggagacat acgtgaacaa actccatgaa ggatcaactt acacagctgc tgttcagtag 60
aatgtcatag aaaaagatga tgatcctgca tctctcacia tatgggttcc tatgttccaa 120

ES 2 796 725 T3

```

tcatccatct ctgctgattt gcttataaaa gaactaatca atgtgaacat attagttcga      180
caaattttcta ctctgaaaagg tccttcattg aagattatga taaactcaag aagtgcgtga      240
ctagcccaaaa tgcccagcaa atttaccata agtgcaaagtg tatcattgga tgaacgaagc      300
aaatttagcat atgacataac tactccttgt gaaattaagg cttgtagttt aacatgttta      360
aaggtgaaaa atatgctcac aactgtgaaa gatctcacca tgaaaacatt caatcctacc      420
catgagatca ttgcactgtg tgaatttgaa aatatcatga catccaaaag agttgttata      480
ccaacttttct taagggtcaat caatgtaaaa gcaaaggatt tggactcact agagaatata      540
gctaccacag agttcaaaaa tgccatcact aatgctaaaa ttatacctta tgctggggtg      600
gtattagtta tcaactgtaac tgacaataaa ggggcattca agtacattaa accacaaagt      660
caatttatag tagatcttgg tgcataatcta gagaaagaga gcatatatta tgtaactaca      720
aattggaaac acacggccac taaattctcc attaagccta tagaggactg a              771

```

<210> 12

<211> 256

<212> PRT

5 <213> Virus sincitial respiratorio bovino

<400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 796 725 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 771

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína M del RSV bovino optimizada por codones

<400> 13

atggagactt acgtgaacaa gctgcacgag ggttcacact acaccgctgc tgtgcagtac 60

aacgtgatcg agaaggacga cgaccccgct tccttgacca tctgggtgcc catgttccag 120

tcctccatct ccgctgacct gctgatcaag gagctgatca acgtcaacat cctcgtgcgt 180

cagatctcca ccctgaaggg tcccagcctg aagatcatga tcaactcccg ttccgctgtg 240

ctggctcaga tgccctccaa gttcaccatc tccgccaaacg tgtccctgga cgagcgttcc 300

aagctggctt acgacatcac caccacctgc gagatcaagg cttgctccct gacctgcctg 360

aaggtcaaga acatgctgac caccgtgaag gacctgacca tgaagacctt caacccacc 420

cacgagatca tcgctctgtg cgagttcgag aacatcatga cctccaagcg tgtggtcatc 480

cccacattcc tccgctccat caacgtgaag gctaaggacc tggactccct cgagaacatc 540

gctaccaccg agttcaagaa cgctatcacc aacgctaaga tcatccctta cgctggcctg 600

gtgtggtca tcaccgtgac cgacaacaag ggcgctttca agtacatcaa gccccagtcc 660

cagttcatcg tggacctggg cgcttacctc gagaaggagt ccatctacta cgtcaccacc 720

aactggaagc acaccgctac caagttctcc atcaagccca tcgaggacta a 771

10

<210> 14

<211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Proteína M del RSV bovino optimizada por codones

<400> 14

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 796 725 T3

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

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

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

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

<210> 15

<211> 1176

<212> ADN

5 <213> Virus sincitial respiratorio

<400> 15

```

atggctctta gcaaagtcaa gttgaatgat aactcaaca aagatcaact tctgtcatcc      60
agcaaataca ccatccaacg gagcacagga gatagtattg atactcctaa ttatgatgtg      120
cagaaacaca tcaataagtt atgtggcatg ttattaatca cagaagatgc taatcataaa      180
ttcactgggt taataggtat gttatatgcg atgtctaggt taggaagaga agacaccata      240
aaaatactca gagatgcggg atatcatgta aaagcaaatg gagtagatgt aacaacacat      300
cgtcaagaca ttaatggaaa agaaatgaaa tttgaagtgt taacattggc aagcttaaca      360
actgaaattc aaatcaacat tgagatagaa tctagaaaat cctacaaaaa aatgctaaaa      420
gaaatgggag aggtagctcc agaatacagg catgactctc ctgattgtgg gatgataata      480
ttatgtatag cagcattagt aataactaaa ttagcagcag gggacagatc tggctctaca      540
gccgtgatta ggagagctaa taatgtccta aaaaatgaaa tgaaacgtta caaaggctta      600
ctaccaagag acatagccaa cagcttctat gaagtgtttg aaaaacatcc ccactttata      660
gatgtttttg ttcatttttg tatagcacia tcttctacca gaggtggcag tagagttgaa      720
gggatttttg caggattgtt tatgaatgcc tatggtgcag ggcaagtgat gttacggtgg      780
ggagtcttag caaaatcagt taaaaatatt atgttaggac atgctagtgt gcaagcagaa      840
atggaacaag ttgttgaggt ttatgaatat gcccaaaaat tgggtggtga agcaggattc      900
taccatatat tgaacaaccc aaaagcatca ttattatctt tgactcaatt tcctcacttc      960
tccagtgtag tattaggcaa tgctgctggc ctaggcataa tgggagagta cagaggtaca     1020
ccgaggaatc aagatctata tgatgcagca aaggcatatg ctgaacaact caaagaaaat     1080
ggtgtgatta actacagtgt actagacttg acagcagaag aactagaggc tatcaaacat     1140
cagcttaatc caaaagataa tgatgtagag ctttga                                1176

```

<210> 16

<211> 391

10 <212> PRT

<213> Virus sincitial respiratorio

ES 2 796 725 T3

<400> 16

Met	Ala	Leu	Ser	Lys	Val	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Lys	Asp	Gln
1				5					10					15	
Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Tyr	Thr	Ile	Gln	Arg	Ser	Thr	Gly	Asp	Ser
			20					25					30		
Ile	Asp	Thr	Pro	Asn	Tyr	Asp	Val	Gln	Lys	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Cys
		35					40					45			
Gly	Met	Leu	Leu	Ile	Thr	Glu	Asp	Ala	Asn	His	Lys	Phe	Thr	Gly	Leu
	50					55					60				
Ile	Gly	Met	Leu	Tyr	Ala	Met	Ser	Arg	Leu	Gly	Arg	Glu	Asp	Thr	Ile
65					70					75					80
Lys	Ile	Leu	Arg	Asp	Ala	Gly	Tyr	His	Val	Lys	Ala	Asn	Gly	Val	Asp
				85					90					95	
Val	Thr	Thr	His	Arg	Gln	Asp	Ile	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Lys	Phe	Glu
			100					105					110		
Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu	Ile	Gln	Ile	Asn	Ile	Glu
		115					120					125			
Ile	Glu	Ser	Arg	Lys	Ser	Tyr	Lys	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Met	Gly	Glu
	130					135					140				
Val	Ala	Pro	Glu	Tyr	Arg	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Cys	Gly	Met	Ile	Ile
145					150					155					160
Leu	Cys	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Thr	Lys	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Arg
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Arg	Ala	Asn	Asn	Val	Leu	Lys	Asn
			180					185					190		
Glu	Met	Lys	Arg	Tyr	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Ala	Asn	Ser
		195					200					205			
Phe	Tyr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	His	Pro	His	Phe	Ile	Asp	Val	Phe	Val
	210					215					220				

ES 2 796 725 T3

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
 245 250 255
 Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
 260 265 270
 Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
 275 280 285
 Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
 290 295 300
 Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
 305 310 315 320
 Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
 325 330 335
 Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
 355 360 365
 Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
 370 375 380
 Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
 385 390

<210> 17

<211> 1176

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína N del RSV optimizada por codones

<400> 17

atggctctgt ccaaggtcaa gctgaacgac accctgaaca aggaccagct gctgtcctcc	60
tccaagtaca ccatccagcg ttccaccggt gactccatcg acacccccaa ctacgacgtg	120
cagaagcaca tcaacaagct gtgcggcatg ctgctgatca ccgaggacgc taaccacaag	180
ttcaccggtc tgatcggcat gctgtacgct atgtcccgtc tgggtcgtga ggacaccatc	240
aagatcctgc gtgacgctgg ttaccacgtg aaggctaacg gtgtcgacgt gaccaccac	300

ES 2 796 725 T3

```

cgtcaggaca tcaacggcaa ggagatgaag ttcgaggtcc tgaccctggc ttccttgacc      360
accgagatcc agatcaacat cgagatcgag tcccgtaagt cctacaagaa gatgctgaag      420
gagatgggcg aggtcgcccc cgagtaccgt cagcactccc ccgactgcgg catgatcatc      480
ctgtgcatcg ctgctctcgt catcaccaag ctggctgctg gtgaccgttc cggctctgacc      540
gctgtgatcc gtcgtgctaa caacgtgctg aagaacgaga tgaagcgcta caagggctctg      600
ctgccccagg acatcgctaa cagcttctac gaggtgttcg agaagcaccc ccacttcatc      660
gacgtgttcg tgcacttcgg tatcgctcag tcctccaccc gtgggtggtc ccgtgtggag      720
ggcatcttcg ctggtctggt catgaacgct tacggtgctg gccaggtcac gctgcgttgg      780
ggtgtgctgg ctaagtccgt gaagaacatc atgctgggtc acgcttccgt gcaggctgag      840
atggagcagg tgggtggaggt gtacgagtac gctcagaagc tgggcggcga ggctggtttc      900
taccacatcc tgaacaaccc caaggcttcc ctgctgtccc tgaccagtt ccccccacttc      960
tcctccgtgg tgctgggtaa cgctgctggt ctgggtatca tgggcgagta ccgtggcacc     1020
ccccgtaacc aggacctgta cgacgctgct aaggcttacg ccgagcagct caaggagaac     1080
ggcgtcatca actactccgt gctggacctg accgctgagg agctggaggc tatcaagcac     1140
cagctgaacc ccaaggacaa cgacgtggag ctgtaa                                1176

```

<210> 18

<211> 391

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína N del RSV optimizada por codones

<400> 18

```

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 796 725 T3

Val	Thr	Thr	His	Arg	Gln	Asp	Ile	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Lys	Phe	Glu	
			100			105						110				
Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Thr	Glu	Ile	Gln	Ile	Asn	Ile	Glu	
			115			120						125				
Ile	Glu	Ser	Arg	Lys	Ser	Tyr	Lys	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Met	Gly	Glu	
			130			135						140				
Val	Ala	Pro	Glu	Tyr	Arg	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Cys	Gly	Met	Ile	Ile	
			145			150						155			160	
Leu	Cys	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Thr	Lys	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp	Arg	
			165			170						175				
Ser	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Arg	Ala	Asn	Asn	Val	Leu	Lys	Asn	
			180			185						190				
Glu	Met	Lys	Arg	Tyr	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Ala	Asn	Ser	
			195			200						205				
Phe	Tyr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	His	Pro	His	Phe	Ile	Asp	Val	Phe	Val	
			210			215						220				
His	Phe	Gly	Ile	Ala	Gln	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Val	Glu	
			225			230						235			240	
Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	Leu	Phe	Met	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gly	Gln	Val	
			245			250						255				
Met	Leu	Arg	Trp	Gly	Val	Leu	Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Asn	Ile	Met	Leu	
			260			265						270				
Gly	His	Ala	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Met	Glu	Gln	Val	Val	Glu	Val	Tyr	
			275			280						285				
Glu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu	Gly	Gly	Glu	Ala	Gly	Phe	Tyr	His	Ile	Leu	
			290			295						300				
Asn	Asn	Pro	Lys	Ala	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Pro	His	Phe	
			305			310						315			320	
Ser	Ser	Val	Val	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Met	Gly	Glu	
			325			330						335				
Tyr	Arg	Gly	Thr	Pro	Arg	Asn	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	

ES 2 796 725 T3

340

345

350

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

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

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
385 390

<210> 19

<211> 1725

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 368

<400> 19

atggagctgc tcatcttgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc	60
tgctttgcat ccggtcagaa tattaccgaa gagttctacc aatctacttg tagcgctgtc	120
tcaaaaggct atctatcggc cttacgtaca ggatgggtaca cgagtgttat caccatcgaa	180
ctgtccaaca ttaaggagaa taaatgcaac ggtactgacg cgaaggtaaa gctcatcaaa	240
caggaattgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagcttc aactgctaata gcagtctacc	300
ccccctacga ataaccgcgc taggagagaa ctcccacgat tcatgaacta tactttaaat	360
aacgccaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcgta agcgaggtt tctgggcttc	420
cttctcggag ttggttcagc tattgcgtcg ggcgtagccg tgagtaaagt cttgcacctg	480
gagggagaag ttaataagat caagtccgca ctctgtctta ctaacaaagc tgtggtcagc	540
ctatcaaacg gtgtatccgt gttaacctcg aaggttcttg acttgaaaaa ttacatcgat	600
aagcaactcc tgccgattgt caacaagcag agttgttcta tcagcaatat tgagacgggtg	660
atcgagttcc aacagaaaaa caacagattg ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaaata	720
gccggcggtta ctacccccgt ctccacgtac atgctaacaa actcggaatt acttagtctc	780
attaacgaca tgctatcac taatgatcag aagaagttga tgtctaacaa cgtgcaaatt	840
gtccgccagc aaagctattc catcatgtca atcattaaag aggaagtgtc ggcgtacgta	900
gttcagctcc cactgtacgg agtcacgac acccgtgct ggaagctaca tacctcgccc	960
ttatgtacga caaatactaa agagggttct aacatttgcc ttaccaggac ggatcgaggc	1020
tggtattgctg ataacgctgg aagtgtgagc ttcttccctc aagcagaaac atgtaaggta	1080
cagtccaata gagttttttg cgacactatg aactcattga ccctcccatc tgagatcaat	1140
ctgtgtaacg tcgatatctt caaccggaag tacgactgca aaattatgac gtccaagaca	1200

ES 2 796 725 T3

```

gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcacta ggtgccatcg tttcttgcta cggcaagacc      1260
aaatgtacgg cttccaataa gaaccgtgga attatcaaaa cattctcgaa cggttgcgac      1320
tatgtcagca ataaggcat ggacactgtg agtgtaggaa acacctata ctacgttaac      1380
aagcaagaag gtaaactact ttatgtcaag ggcgagccca ttatcaattt ttacgatcct      1440
ttggtgttcc catccgacga gttcgatgcg tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac      1500
cagtcctcgc catttatccg caaatcggac gagctgctac acaatgttaa cgccggaaag      1560
agtagcacia acattatgat cactaccatc attatcgtca ttatcgtgat ccttttgtca      1620
ctcattgctg taggtctgtt actatactgt aaagcgaggt ctacgcccggt tacacttagc      1680
aaggatcaat tgtccggcat caataacatt gccttctcga attaa                        1725

```

<210> 20

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 368

<400> 20

```

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1                               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

```

ES 2 796 725 T3

130		135		140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu				
145		150		155
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
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
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

ES 2 796 725 T3

```

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 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> 21

<211> 560

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína F 623

<400> 21

```

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

```


ES 2 796 725 T3

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	Ala	Thr	Asn	Asn	Arg	Ala	Asn	Asn	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	Arg	Arg	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu
	130					135					140				
His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr
145					150					155					160
Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser
				165					170					175	
Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	His	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile
			180					185					190		
Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu
		195					200					205			
Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser
	210					215					220				
Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn
225					230					235					240
Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln
				245					250					255	
Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr
			260					265					270		

ES 2 796 725 T3

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 275 280 285
 Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 290 295 300
 Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 305 310 315 320
 Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 325 330 335
 Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 340 345 350
 Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 355 360 365
 Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 370 375 380
 Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 385 390 395 400
 Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 405 410 415
 Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 420 425 430
 Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 435 440 445
 Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 450 455 460
 Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 465 470 475 480
 Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 485 490 495
 Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met
 500 505 510
 Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile
 515 520 525
 Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr
 530 535 540
 Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 545 550 555 560

<210> 22

<211> 252

ES 2 796 725 T3

<212> PRT

<213> Virus de la gripe aviar

<400> 22

```

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
 1          5          10          15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu Asp Val Phe
          20          25          30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
          35          40          45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50          55          60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65          70          75          80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
          85          90          95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
          100          105          110

Lys Glu Val Ser Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
          115          120          125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
          130          135          140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
          145          150          155          160

Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
          165          170          175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
          180          185          190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Asn Gln
          195          200          205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Asn
          210          215          220

Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
          225          230          235          240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
          245          250

```

5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión secundario

5 <400> 23

Arg Ala Arg Arg
1

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de escisión primario

<400> 24

Lys Lys Arg Lys Arg Arg
1 5

15 <210> 25

<211> 897

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Proteína G del RSV optimizada por codones

<400> 25

atgtccaaga	acaaagacca	gcgtaccgct	aagactctgg	agcgacatg	ggatacgctc	60
aatcacttgc	ttttcatctc	tagctgcctg	tacaaactca	acttgaagtc	agtggcccaa	120
attacccttt	cgatcctggc	gatgattatc	agtacttccc	tcatcattgc	agctatcatt	180
tttatcgcct	ctgcgaatca	taaggtcaca	cccacgaccg	caatcattca	ggacgctact	240
agccaaatca	aaaacacaac	ccctacgtat	ttgactcaga	acccacaact	gggtatttca	300
ccgtcgaatc	ccagtgaaat	cacctcccag	atcacaaacta	ttcttgccctc	taccacgcct	360
ggcgттаага	gcacactcca	atcaactacc	gtaaagacga	aaaacacaac	taccacccag	420
acgcagccat	ccaagccgac	aactaaacaa	aggcagaaca	agcccccttc	gaagccaaat	480
aacgatttcc	acttcgaggt	gtttaacttc	gtcccgtgta	gtatctgctc	taataacccc	540
acctgttggg	ctatttgcaa	aagaatccct	aacaagaagc	caggaaaaaa	gacgacaact	600
aaaccaccca	agaagcctac	gttgaaaaca	actaagaagg	acccgaaacc	acaaaccacg	660
aagagcaaag	aagttcccac	aactaagcct	accgaggaac	cgacgatcaa	tacaactaag	720
accaacatta	tcacgacact	gctcacttca	aataccactg	gtaaccacga	gctgacctcc	780
cagatggaaa	ccttccattc	gacgagttct	gagggcaacc	ccagcccttc	ccaagtatca	840
acaacttcgg	aatacccatc	tcagcccagt	agccctccga	atacccacag	acaataa	897

ES 2 796 725 T3

<210> 26

<211> 298

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Proteína G del RSV optimizada por codones

<400> 26

```

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

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
      20           25           30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
      35           40           45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
 50           55           60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65           70           75           80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
      85           90           95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
      100          105          110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
      115          120          125

```

ES 2 796 725 T3

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
 130 135 140
 Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
 145 150 155 160
 Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
 165 170 175
 Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
 180 185 190
 Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
 195 200 205
 Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
 210 215 220
 Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
 225 230 235 240
 Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
 245 250 255
 Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
 260 265 270
 Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
 275 280 285
 Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
 290 295

<210> 27

<211> 65

<212> PRT

5 <213> Virus sincitial respiratorio

<400> 27

Met Gly Asn Thr Ser Ile Thr Ile Glu Phe Thr Ser Lys Phe Trp Pro
 1 5 10 15
 Tyr Phe Thr Leu Ile His Met Ile Leu Thr Leu Ile Ser Leu Leu Ile
 20 25 30
 Ile Ile Thr Ile Met Ile Ala Ile Leu Asn Lys Leu Ser Glu His Lys
 35 40 45
 Thr Phe Cys Asn Asn Thr Leu Glu Leu Gly Gln Met His Gln Ile Asn
 50 55 60
 Thr
 65

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Mutación del sito de reconocimiento de furina

<400> 28

Lys Lys Gln Lys Gln Gln
1 5

<210> 29

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Mutación del sito de reconocimiento de furina

<400> 29

15 Gly Arg Arg Gln Gln Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión (F) del virus sincitial respiratorio (RSV) que comprende:
 - (i) una delección de uno o más aminoácidos que se alinean con los aminoácidos 137-146 de la SEQ ID NO: 2 de la proteína F del RSV de tipo silvestre;
 - (ii) un sitio de escisión de furina primaria inactivado, en el que el sitio de escisión de furina primaria se inactiva por tres sustituciones de aminoácidos introducidas en posiciones que se alinean con arginina 133, arginina 135 y arginina 136 de la SEQ ID NO: 2; y
 - (iii) sustituciones de aminoácidos de P102A, I379V y M447V.
2. La proteína F del RSV de la reivindicación 1, en la que los tres aminoácidos que se alinean con arginina 133, arginina 135 y arginina 136 de la SEQ ID NO: 2 de la proteína F del RSV de tipo silvestre están sustituidos con glutamina.
3. La proteína F del RSV de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína F del RSV exhibe un aumento en la expresión en una célula hospedadora en comparación con la SEQ ID NO: 2 de la proteína F del RSV de tipo silvestre.
4. Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína F del RSV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 4, en el que la secuencia de ácido nucleico es un codón optimizado para la expresión en células de insecto, y en el que la secuencia de ácidos nucleicos comprende una modificación de uno o más sitios críticos de poli (A).
6. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 4 o la reivindicación 5.
7. Una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende una proteína F del RSV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la proteína F del RSV provoca una respuesta inmune en un hospedero.
8. La proteína F del RSV de la reivindicación 1, en la que la proteína F del RSV carece de un péptido señal N-terminal.
9. Un trímero purificado que comprende una proteína F del RSV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 u 8, en el que cada proteína F del RSV comprende al menos un enlace disulfuro entre las cadenas F1 y F2.
10. Una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable que comprende un trímero purificado de acuerdo con la reivindicación 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el trímero provoca una respuesta inmune en un hospedero.
11. La composición de vacuna de la reivindicación 7 o la reivindicación 10 que comprende además un adyuvante, opcionalmente en la que el adyuvante es alumbre.

FIGURA 1

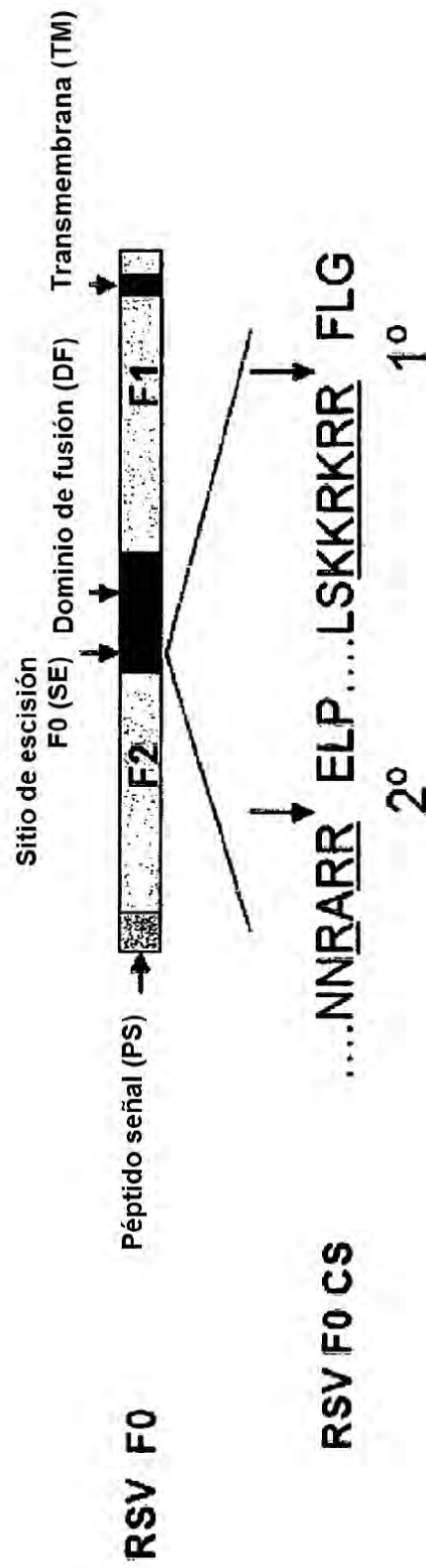


FIGURA 2

Mutaciones en el sitio de escisión evaluadas

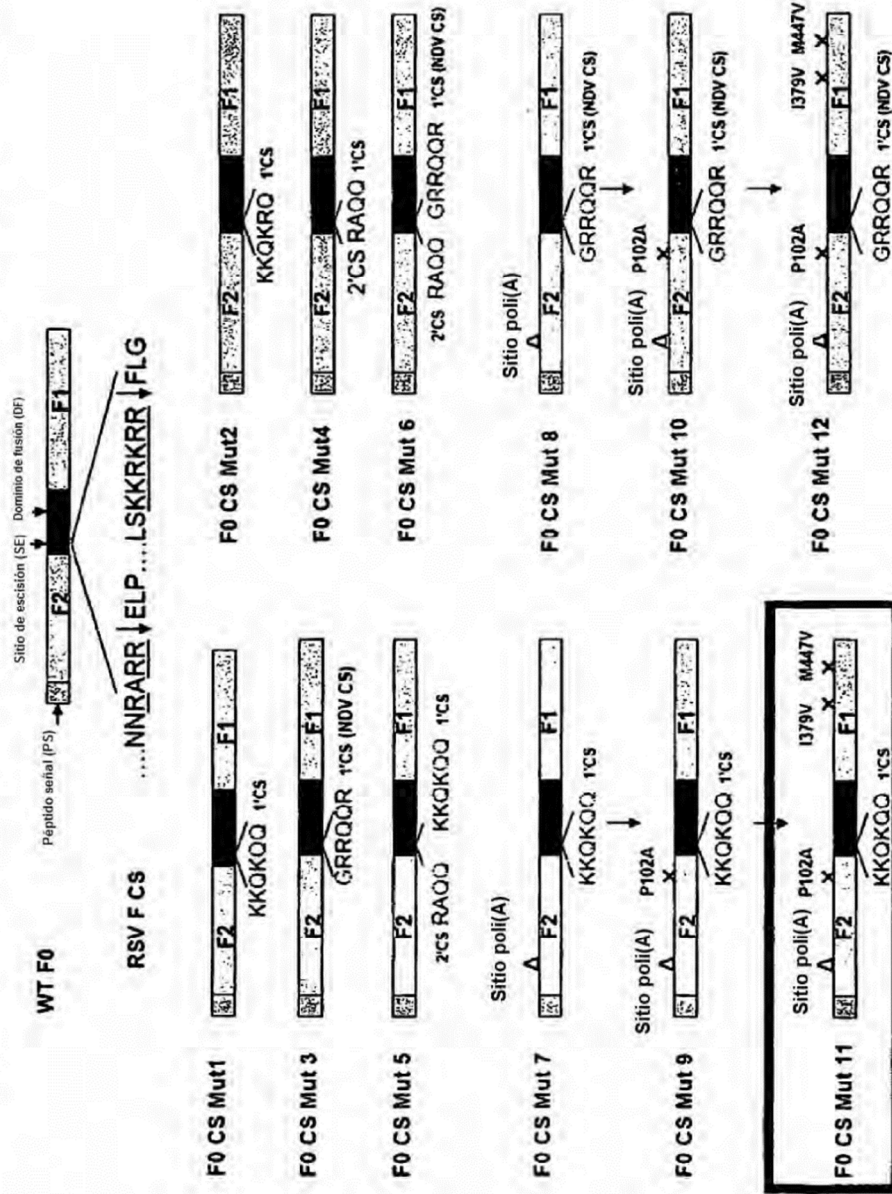


FIGURA 3

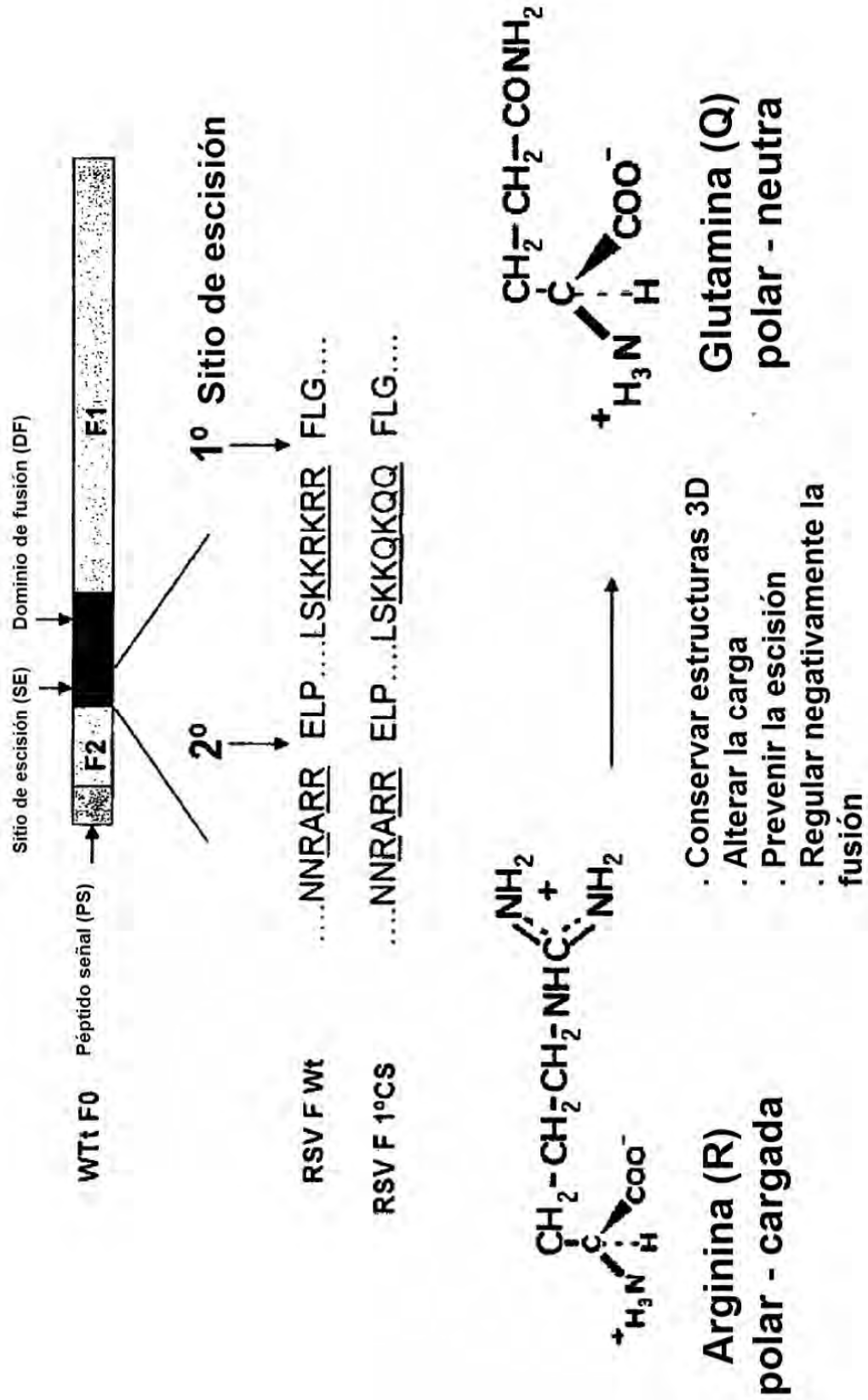


FIGURA 4

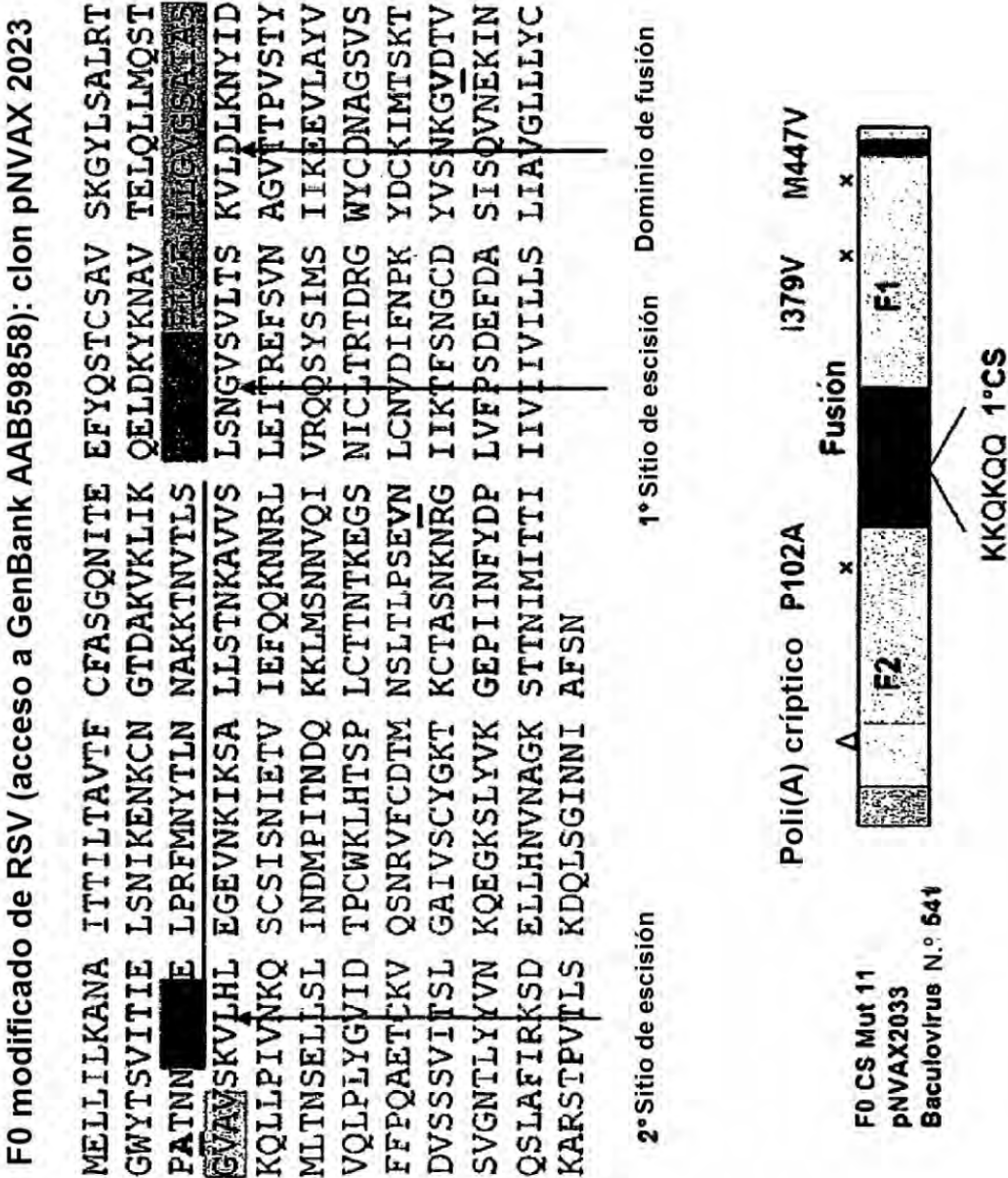
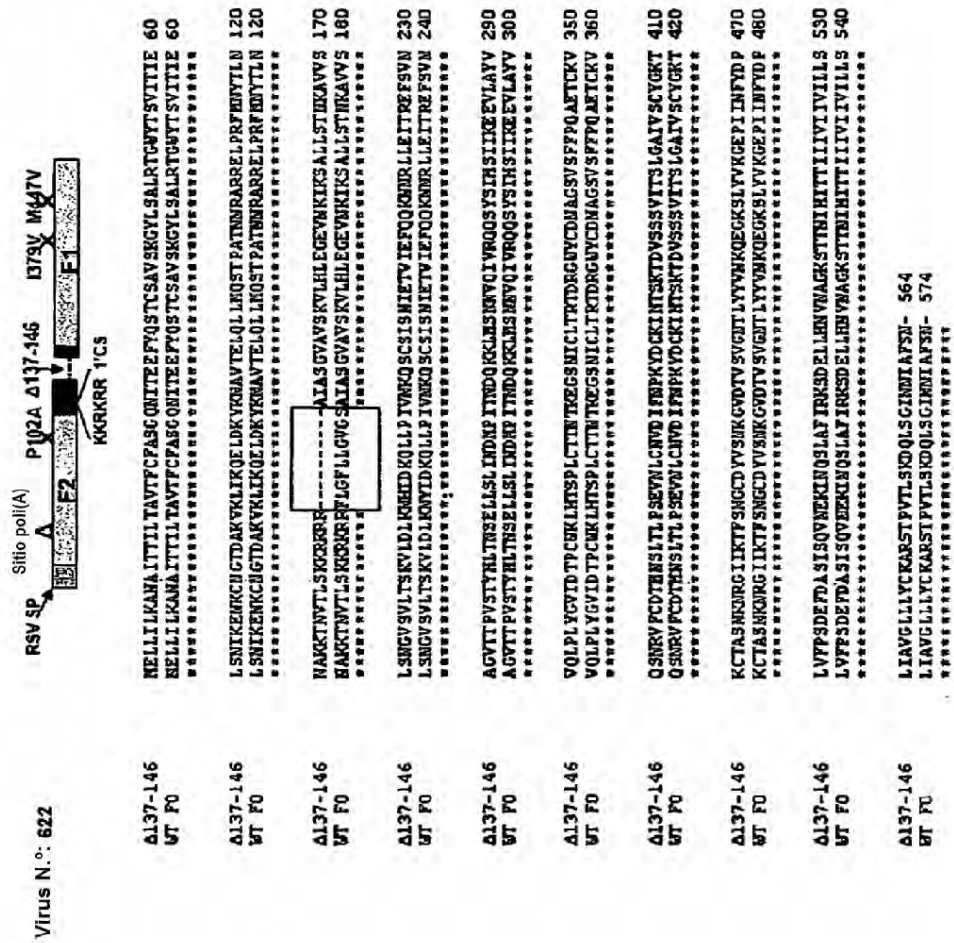


FIGURA 5

Deleción parcial ($\Delta 137-146$) del dominio de fusión F



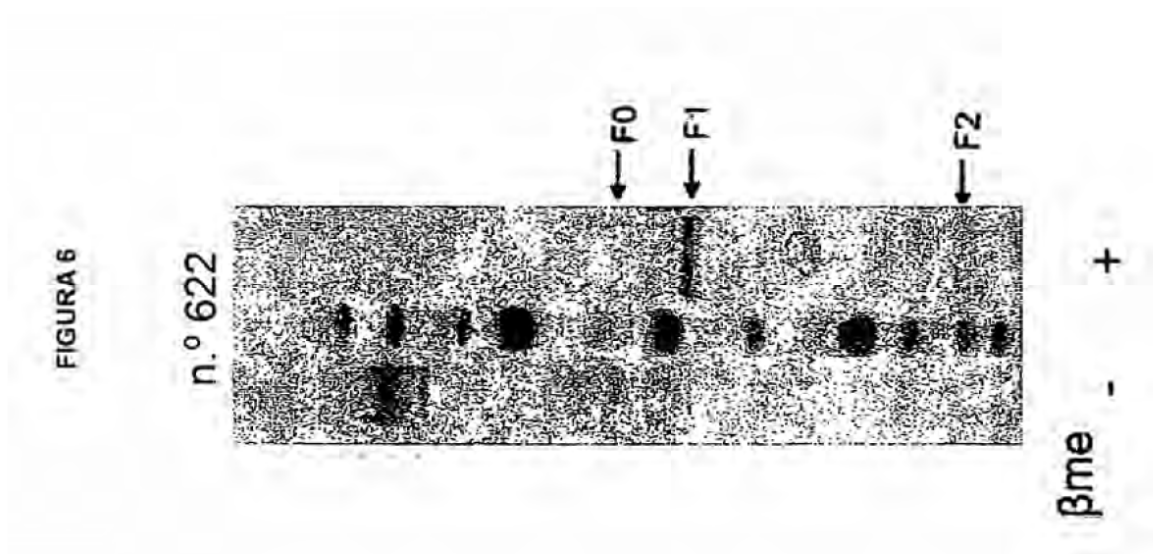
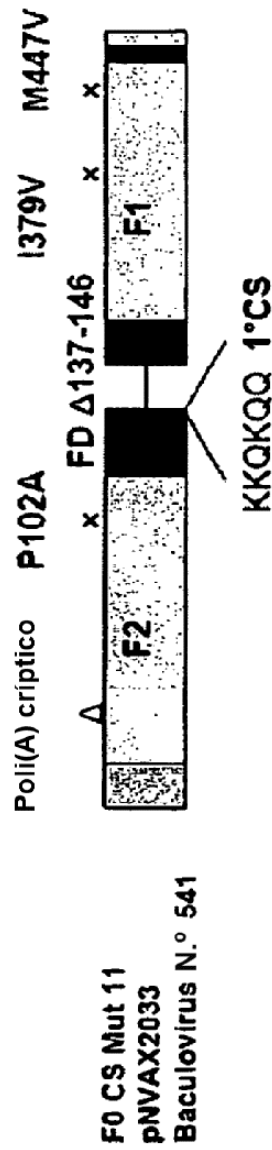


FIGURA 7

F0 de RSV modificado BV n.º 683



- Codón optimizado
- Inactivación del 1^{er} sitio de escisión (3 cambios conservativos de aa)
- Poli(A) críptico en F2 retirado
- 3 correcciones de aa a la secuencia de Genbank
- Deleción de la mitad N-terminal del dominio de fusión F1

FIGURA 8

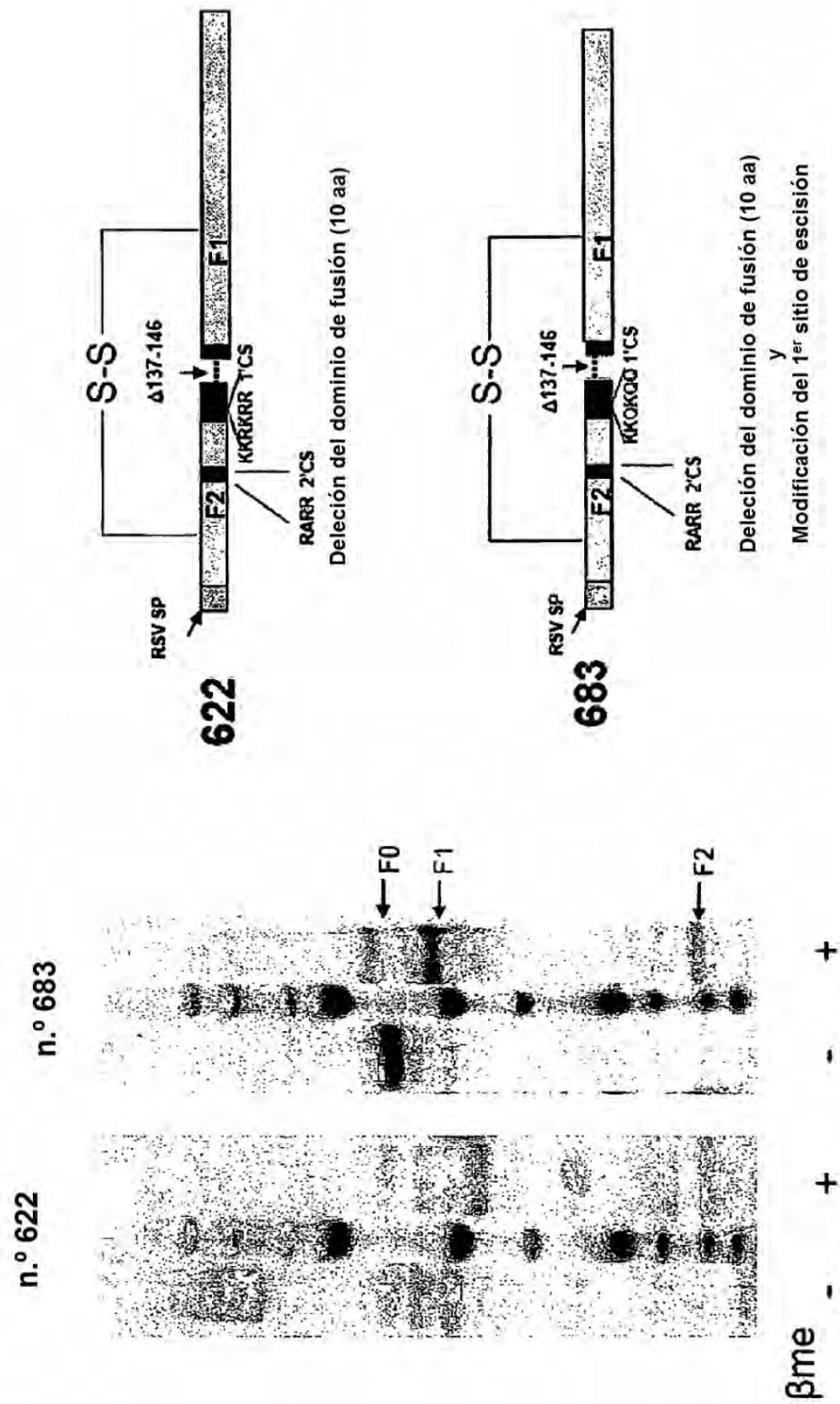


FIGURA 9

F de RSV BV n.º 683 purificada

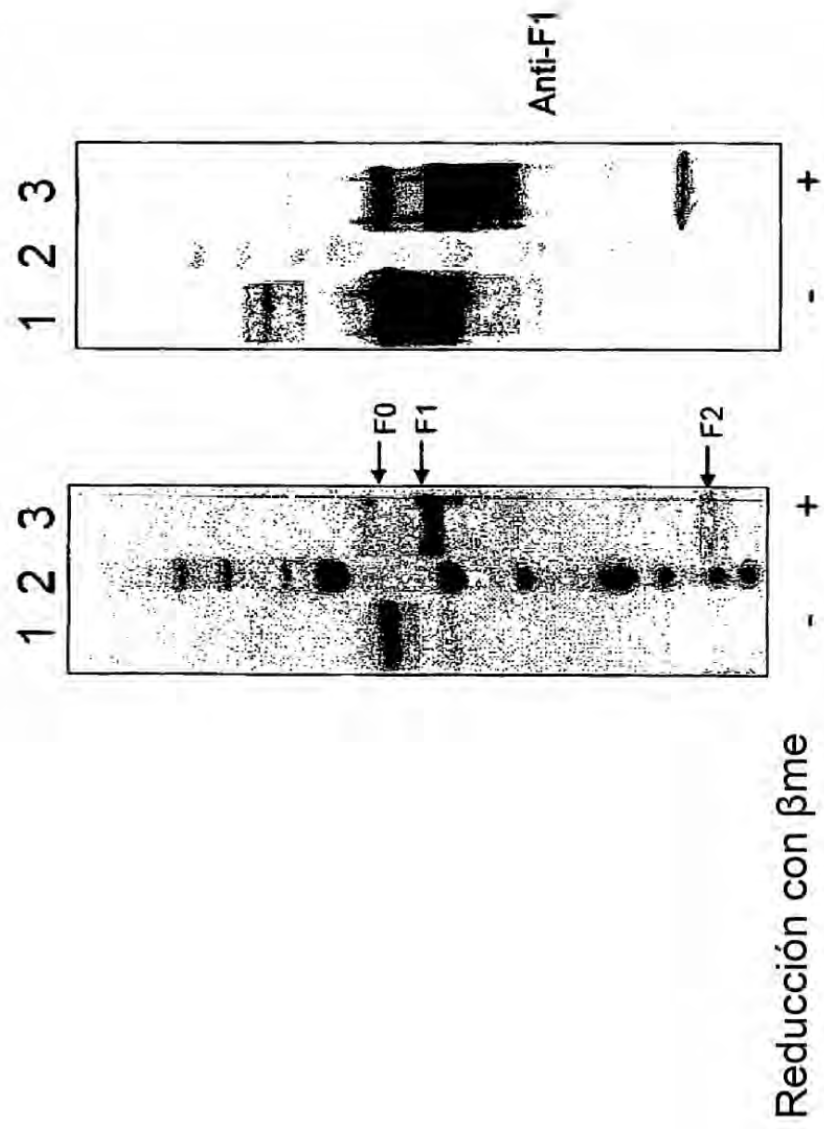
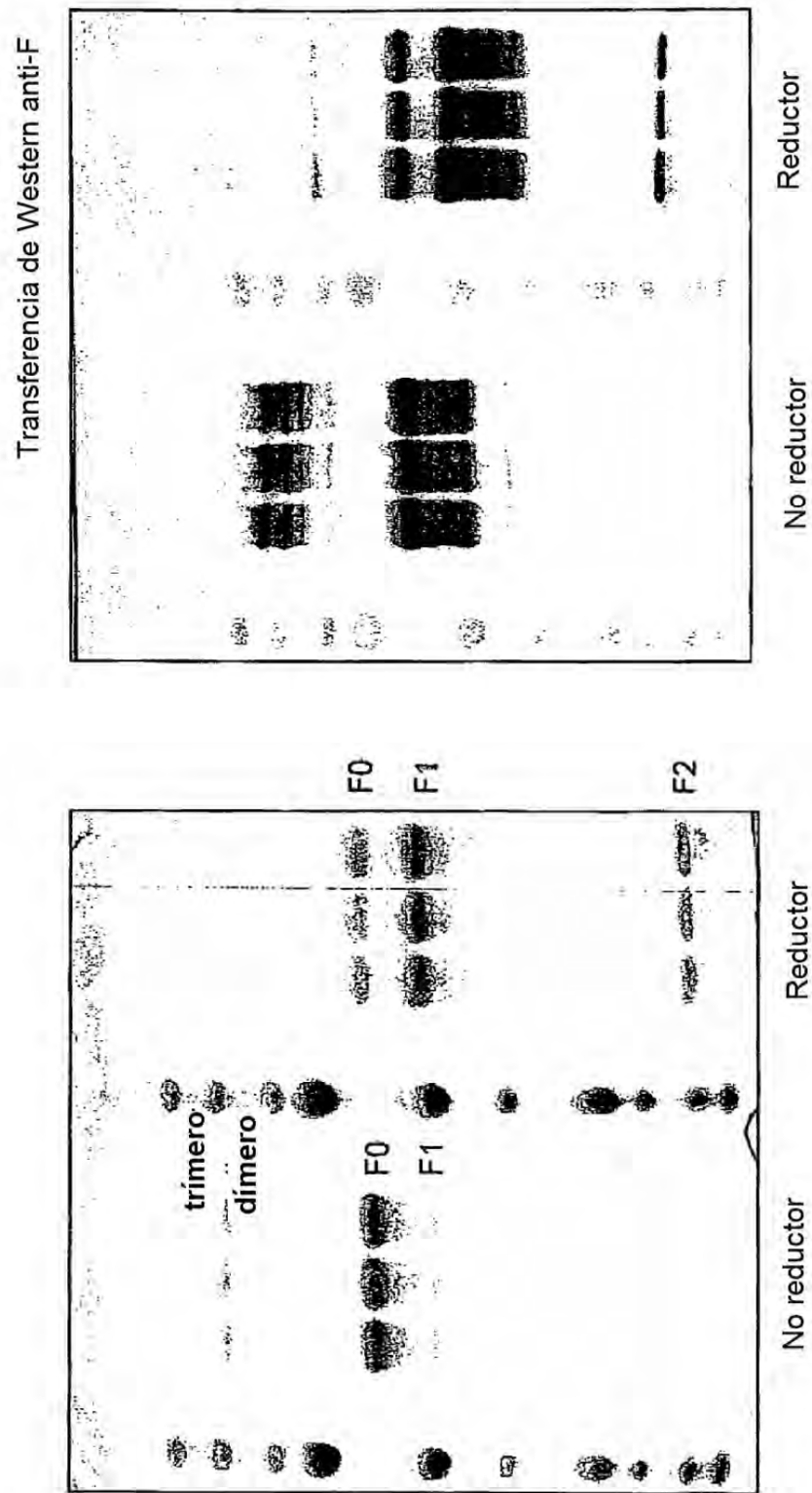


FIGURA 10



Pureza >98 % en densitometría de exploración

FIGURA 11
Micelas (rosetas) de RSV F n.º 683 purificadas

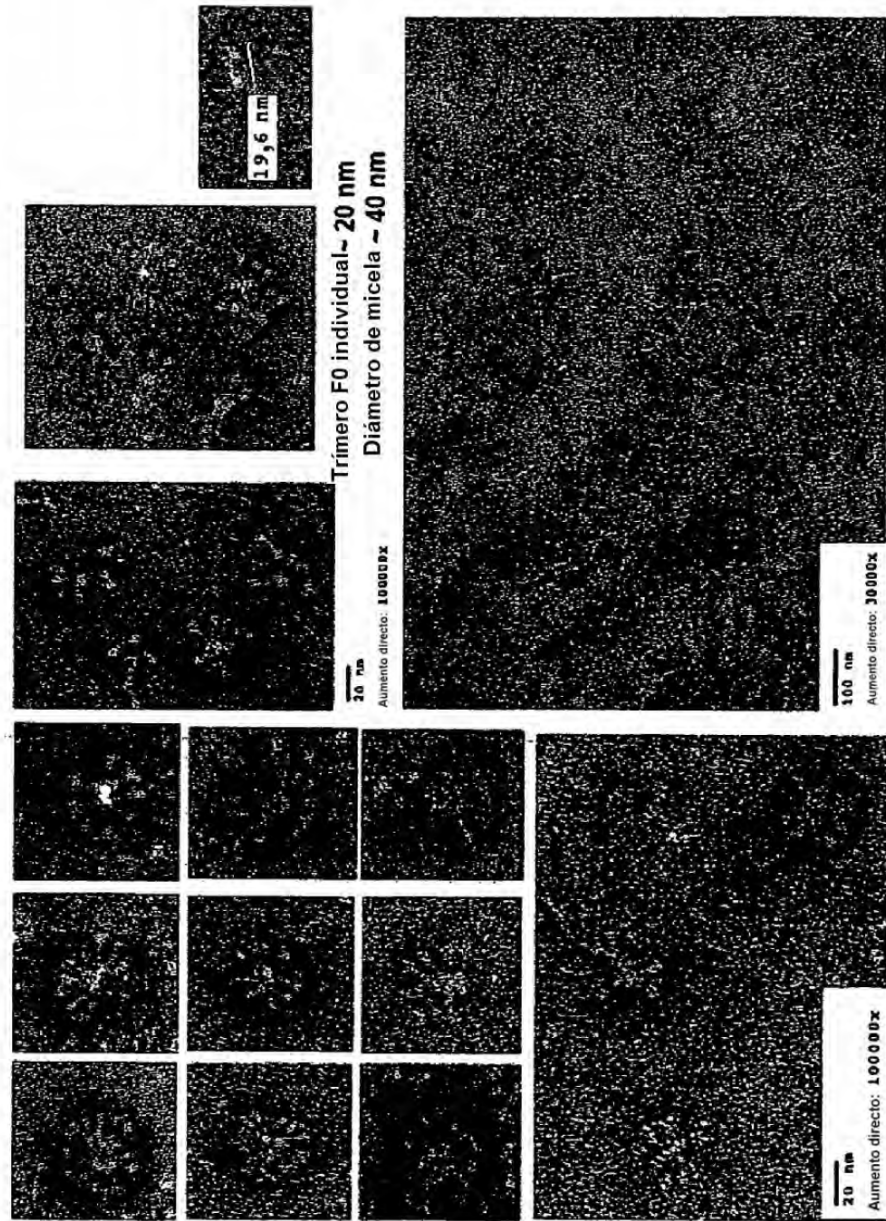


FIGURA 12

El análisis de tamaño de partícula muestra que F0 683 de RSV forma partículas de 40 nm

Resultados

Z-promedio (d.nm): 40,2		Diám. (nm)		% Intensidad Anchura (nm)	
Pdl: 0,383		Pico 1:	91,3	98,4	155
Intersección: 0,823		Pico 2:	4390	1,6	938
		Pico 3:	0,00	0,0	0,00

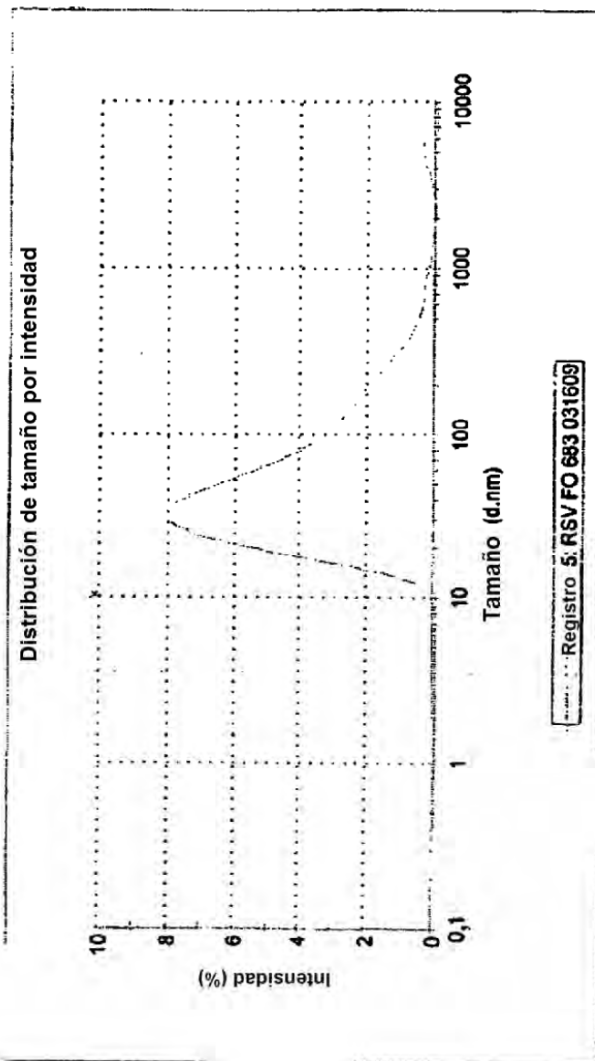


FIGURA 13

F modificada de RSF: BV n.º 622 y n.º 623

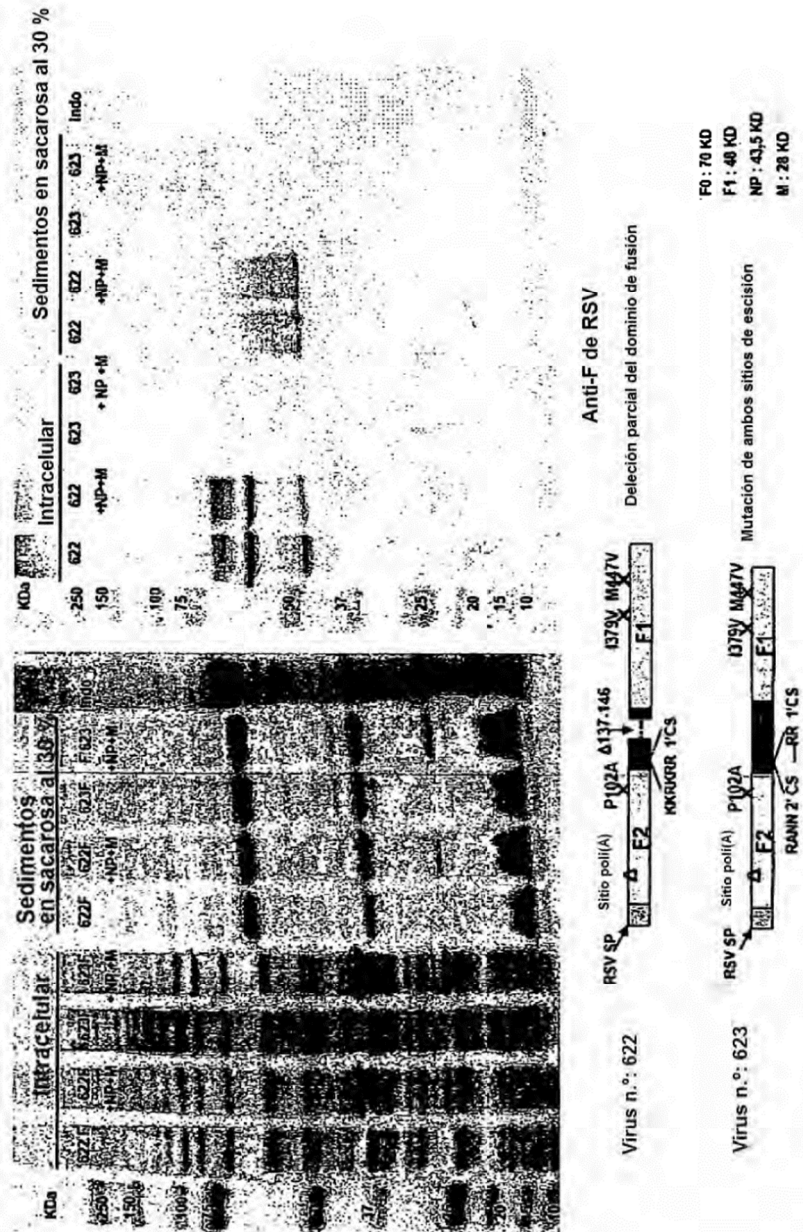


FIGURA 14
Expresión intracelular de mutantes de HRSV, co-infección con M de BRSV y N de HRSV

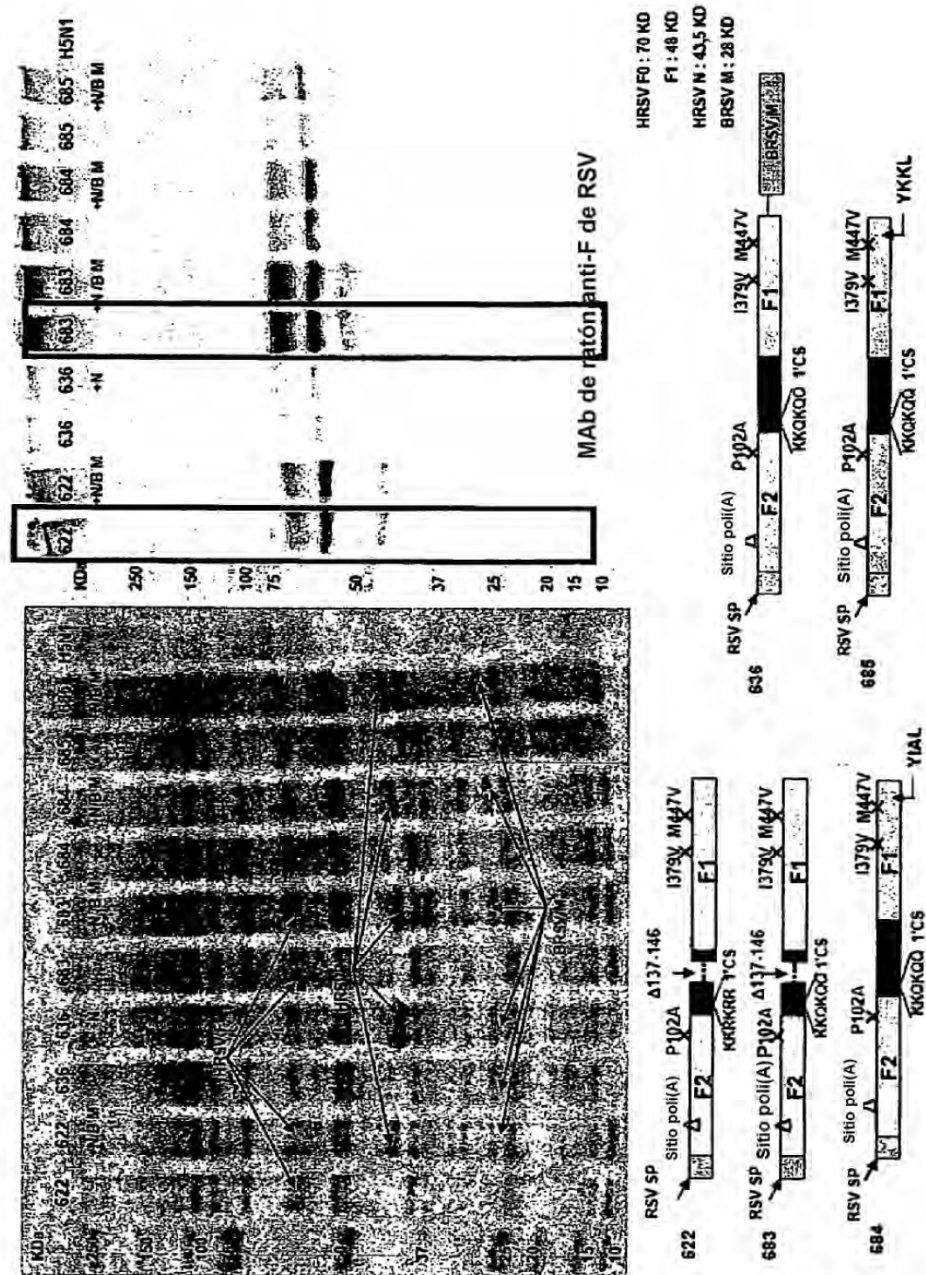


FIGURA 15

VLP en sacarosa al 30 % de mutantes de HRSV, co-infección con M de BRSV y N de HRSV

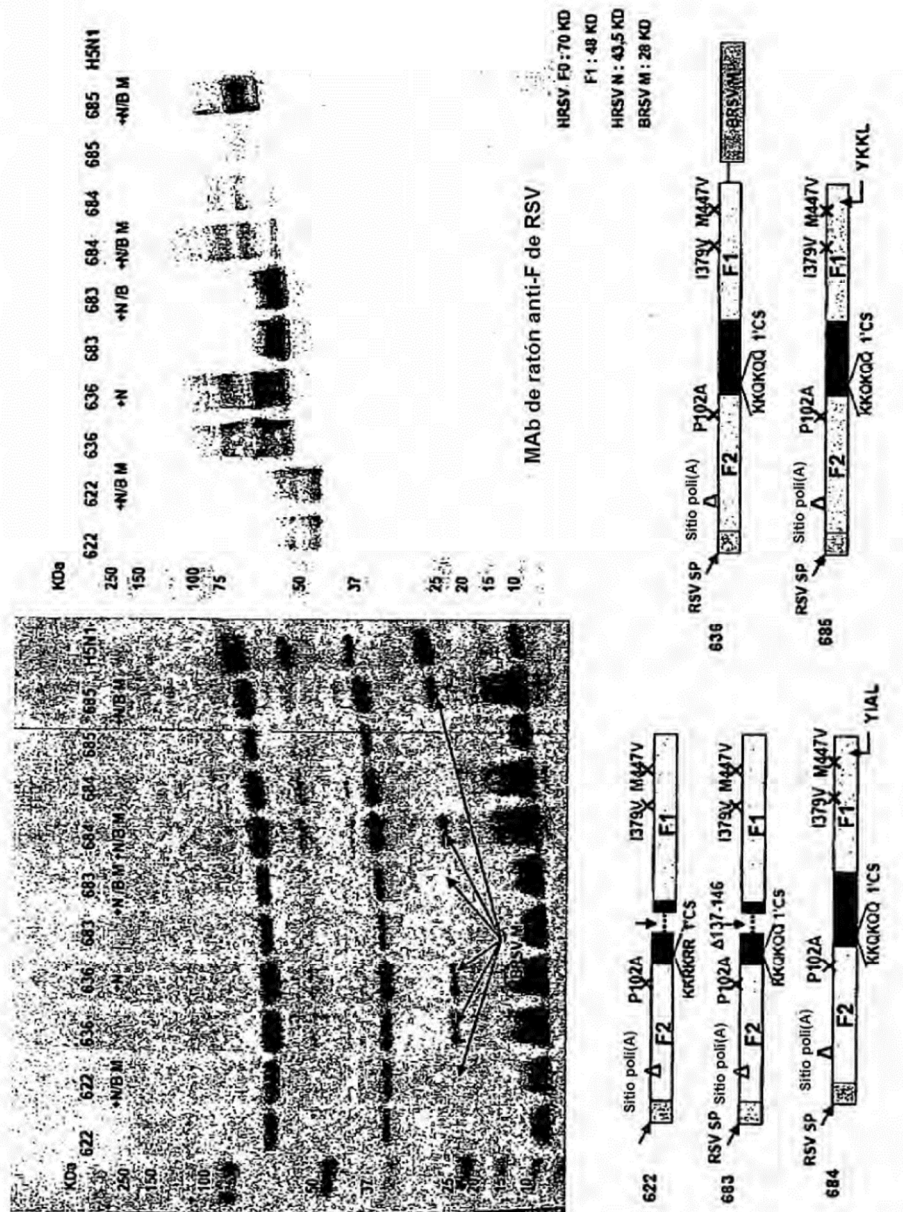


FIGURA 16a

Nombre del clon		Descripción	WB/Coomassie	Conclusión
WT HRSV F0	Genebank		+ / -	Se expresa realmente mal
F1-SP	$\Delta F2$		+++ / ++++	Se expresa bien pero insoluble, podría estar mal plegada
F1 w/ Indo TMCT	$\Delta F2$, F1 química sin SP		+++ / +++	Se expresa bien pero insoluble, podría estar mal plegada
F1-SP w/ Indo TMCT	$\Delta F2$, F1 química con Indo TMCT		+++ / +++	Se expresa bien pero insoluble, podría estar mal plegada
F1-SP w/ Indo	$\Delta F2$, F1 química con TMCT+2AA		+++ / +++	Se expresa bien pero insoluble, podría estar mal plegada
F1-SP w/ Indo	$\Delta F2$, F1 química con TMCT+16 AA		+++ / +++	Se expresa bien pero insoluble, podría estar mal plegada
F0 Δ CS	Reemplazo de CS(KRKRRR) con GASGAG		- / -	No se expresa proteína
F1-SP w/	F1 química con HA de NDV TMCT de NDV		+++ / +++	Se expresa bien pero no se ensambla bien con M de NDV
F1-SP w/NDV TMCT+16AA	F1 química con HA de NDV TMCT de NDV+ 16AA cadena arriba		+++ / +++	Se expresa bien pero no se ensambla bien con M de NDV
F1-SP Δ sitio Pal	Delección sitio de palmitoilación en F1, mejora la solubilidad de F1		+++ / +++	Se expresa bien pero insoluble
MF1 tándem	F1+ HRSV M		F1+++ / F1+, M+	Tanto F1 como M se expresan bien en tándem, pero el rendimiento de VLP es malo. La expresión de M se inhibe cuando se co-infecta con F1
GOMF1 tándem	F1+ HRSV M+ Gb		F1+++ / M++ / F1+, M+	Tanto F1 como M se expresan mejor en tándem triple que co-infección, pero el rendimiento de VLP es muy bajo

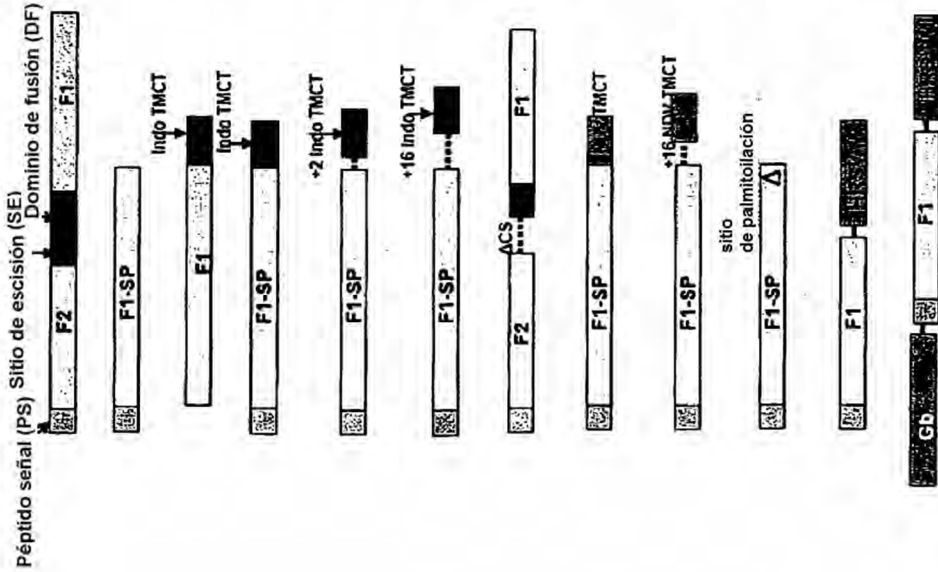


FIGURA 16b

Nombre del clon	Descripción	WB/Coomassie	Conclusión
WT HRSV F0	Genbank, Sitios de escisión intactos	+/ -	Se expresa realmente mal
HRSV F0 mutación triple	1' CS muta a KKQKQKQ	+/ -	La mutación de 1' CS mejora la expresión un poco
HRSV F0 mutación doble	1' CS muta a KKQKQRQ	+/ -	La mutación de 1' CS no mejora la expresión
HRSV F0 con NDV CS (GRRQQR)	1' CS muta a NDV CS (GRRQQR)	+/ -	La mutación de 1' CS no mejora la expresión
HRSV F0 con 2' CS mutación	2' CS muta a RAQQ	++ / -	La mutación de 2' CS mejora la expresión un poco
HRSV F0 (filjo) WT derivado de Genbank, se retira el sitio poli(A) pero cambia de P a A, I a V y M a V	Encontrados errores en WT F0 derivado de Genbank, se retira el sitio poli(A) pero cambia de P a A, I a V y M a V	++ / -	Error fijado en F0 se expresa mejor que F0 de Genbank, pero aún no se expresa bien, puede detectarse por gel ténido con azul
HRSV F0 (filjo) WT con 1' CS mutación (541)	Mutar 1' CS a KKQKQKQ	++ / -	Mutación de 1' CS a KKQKQKQ mejora la expresión de F0, puede ensamblarse con M de BRSV, N de HRSV para formar VLP, rendimiento malo y bajo título de rBV, necesita mejorar
HRSV F0 (filjo) WT con 1' CS mutación	1' CS muta a NDV CS	+/ -	Mutación de 1' CS en NDV CS no mejora la expresión de F0
HRSV F0 (filjo) con 1' CS y 2' CS mutación	Mutar tanto 1' CS como 2' CS	.	Sin expresión de F0
HRSV F0 (filjo) ACS	Deletar CS completo	++ / -	No se expresa bien
HRSV F0 (filjo) w ACS BV SP, Indó TMCT*16AA	Deletar CS, reemplazar SP de HRSV con SP BV, permutar TMCT de HRSV con Indó HA TMCT, * 16AA cadena arriba	++ / -	VLP se ensambla de forma eficaz con Indó M1 pobre

FIGURA 16c

Nombre del clon		Descripción	WB/Coomassie	Conclusión
	HRSV F0 (541) W/ BRSV F0 CT	HRSV F0 CT replaced by BRSV F0 CT	+++/-	El nivel intracelular es similar a 541, pero inhibe M de BRSV cuando se co-infecta. El rendimiento de VLP no es tan bueno como 541
	HRSV F0 (541) + BRSV M	Tándem de doble de genes	F+++ M+++/-	El rendimiento tanto intracelular como de VLP es mejor que co-infección de 541 con M de BRSV.
	HRSV F0 (541) W/ BRSV F0 CT + BRSV M	Tándem de doble de genes	F+++ M+++/-	El rendimiento tanto intracelular como de VLP es mejor que co-infección, inhibición de M de BRSV resuelta
	HRSV F0 FD(G139K)	Introducir mutación puntual G139K (G139K) en el dominio de fusión	++/-	FD(G139K) no mejora la expresión de F0
	HRSV F0 FD(G143K)	Introducir mutación puntual G143K (G139K) en el dominio de fusión	++/-	FD(G143K) no mejora la expresión de F0
	HRSV F0 FD(S150K)	Introducir mutación puntual S150K (G139K) en el dominio de fusión	++/-	FD(S150K) no mejora la expresión de F0
	HRSV F0 FD(S153K)	Introducir mutación puntual G153K (G139K) en el dominio de fusión	++/-	FD(G153K) no mejora la expresión de F0
	HRSV F0 FD(S146K)	Introducir mutación puntual G146K (G139K) en el dominio de fusión	++/-	FD(G146K) no mejora la expresión de F0
	HRSV F0 CS mut	Delecionar 4AA en 1' CS, cambiar 2' CS de RARR a RANN	++/-	Expresión muy pobre de F0
	HRSV F0 CS mut (622)	Delección parcial del dominio de fusión F0 (10AA) Sitio de escisión intacto	++++/+++	Excelente expresión intracelular de F0, banda fuerte en gel de Coomassie
	HRSV F0 CS mut (692)	Delección parcial del dominio de fusión F0 (10AA) 1er Sitio de escisión modificado	++++/++++	Excelente expresión intracelular de F0, banda fuerte en gel de Coomassie

FIGURA 17

Estudio de exposición en ratón de RSV-F

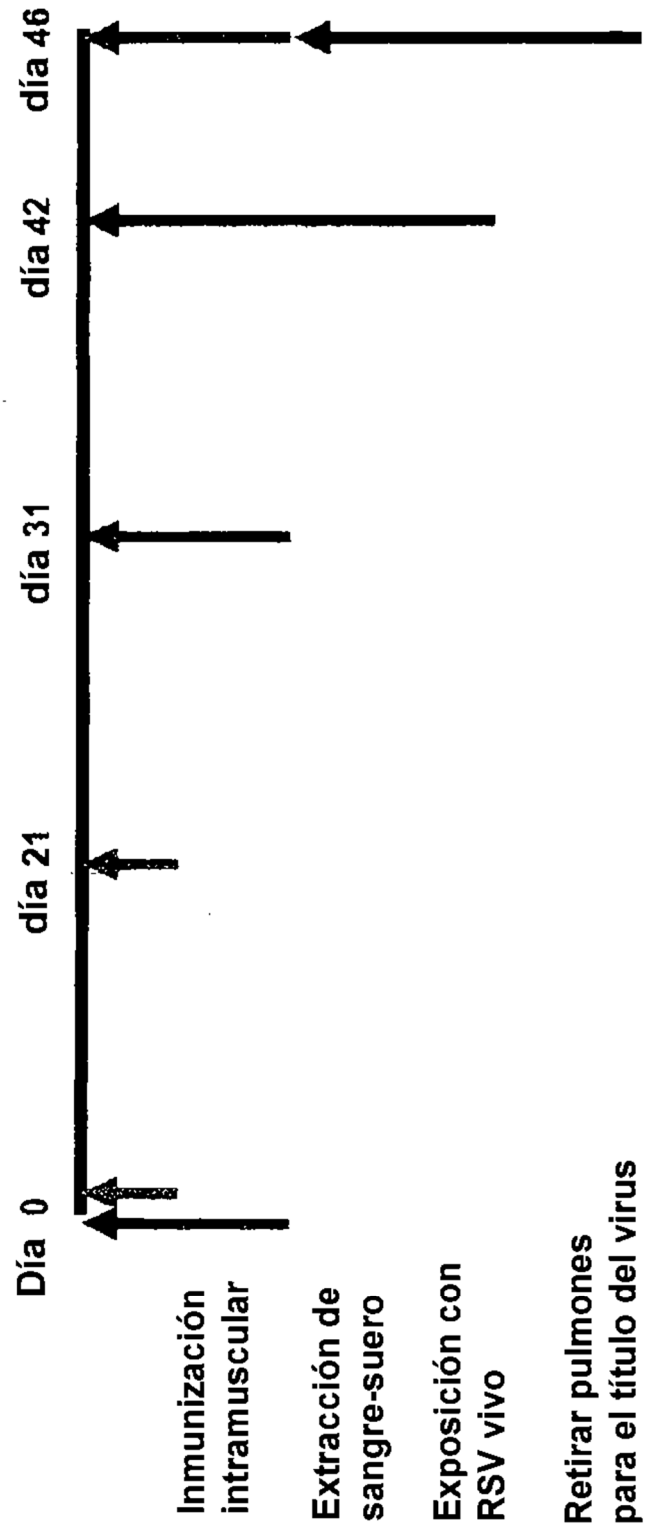


FIGURA 18

Títulos de neutralización de virus Estudio en ratón de RSV-F

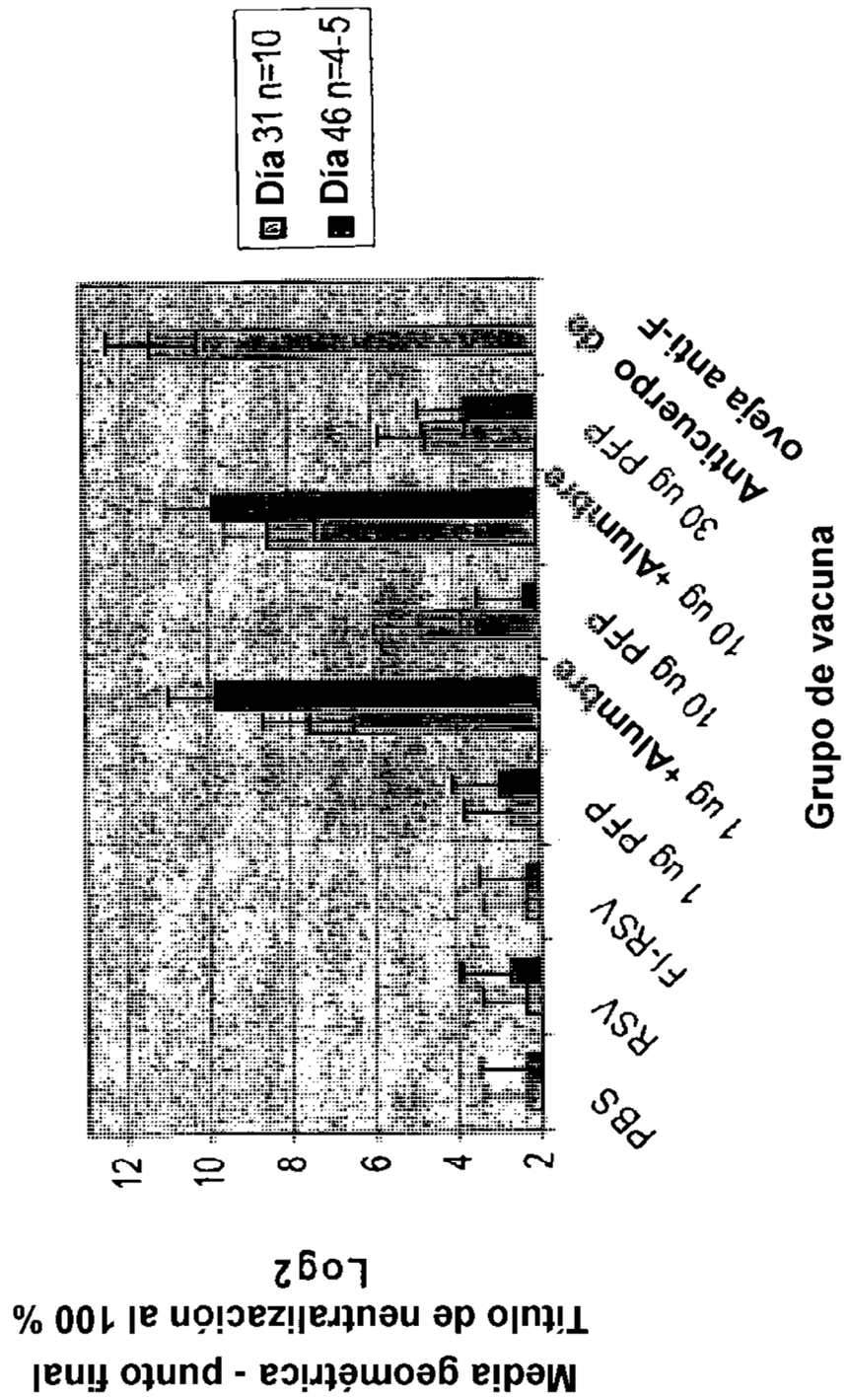
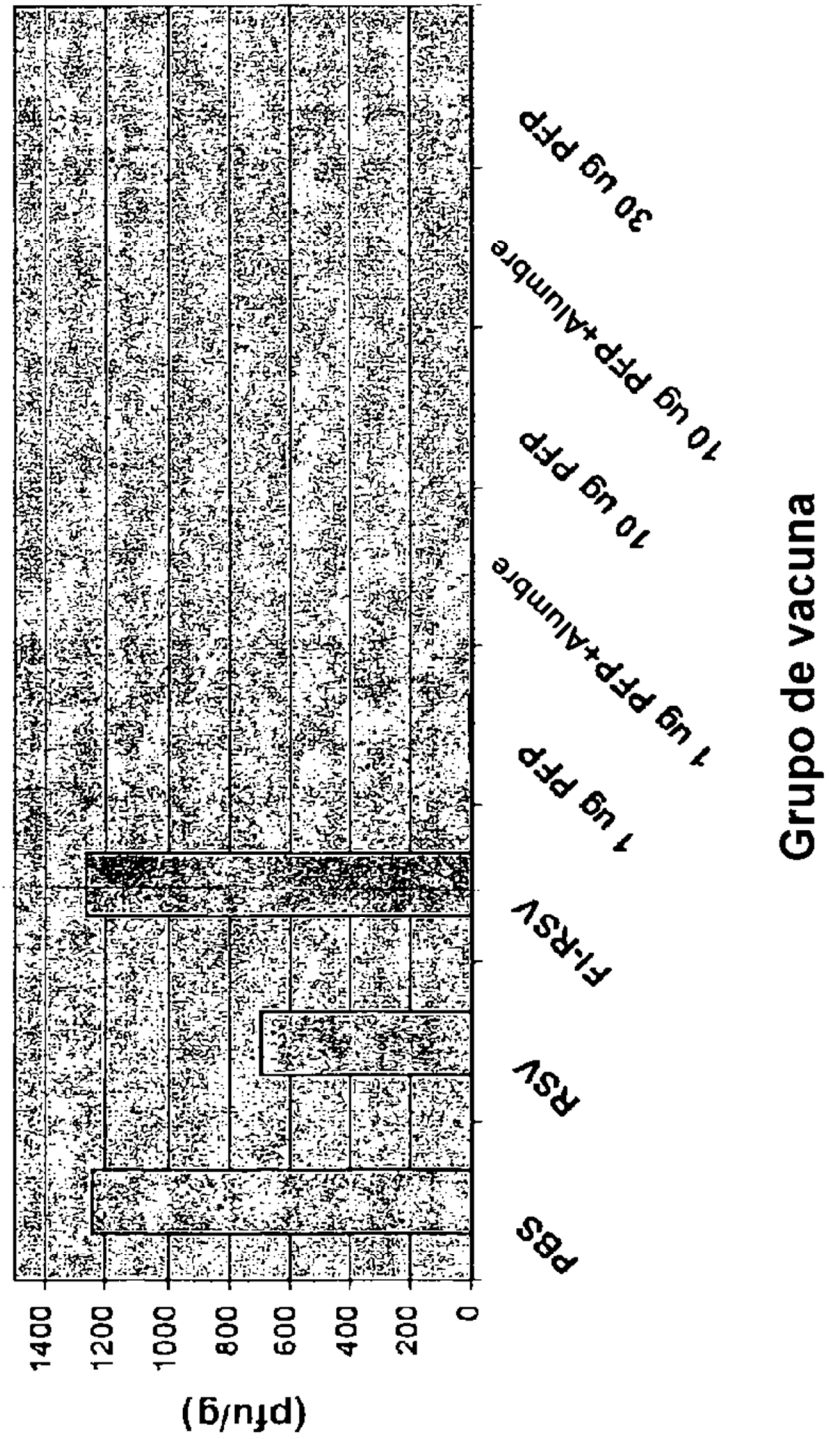


FIGURA 19
Estudio de exposición en ratón de RSV-F
Título en pulmón (pulmón derecho)

Título en pulmón de RSV - media geométrica



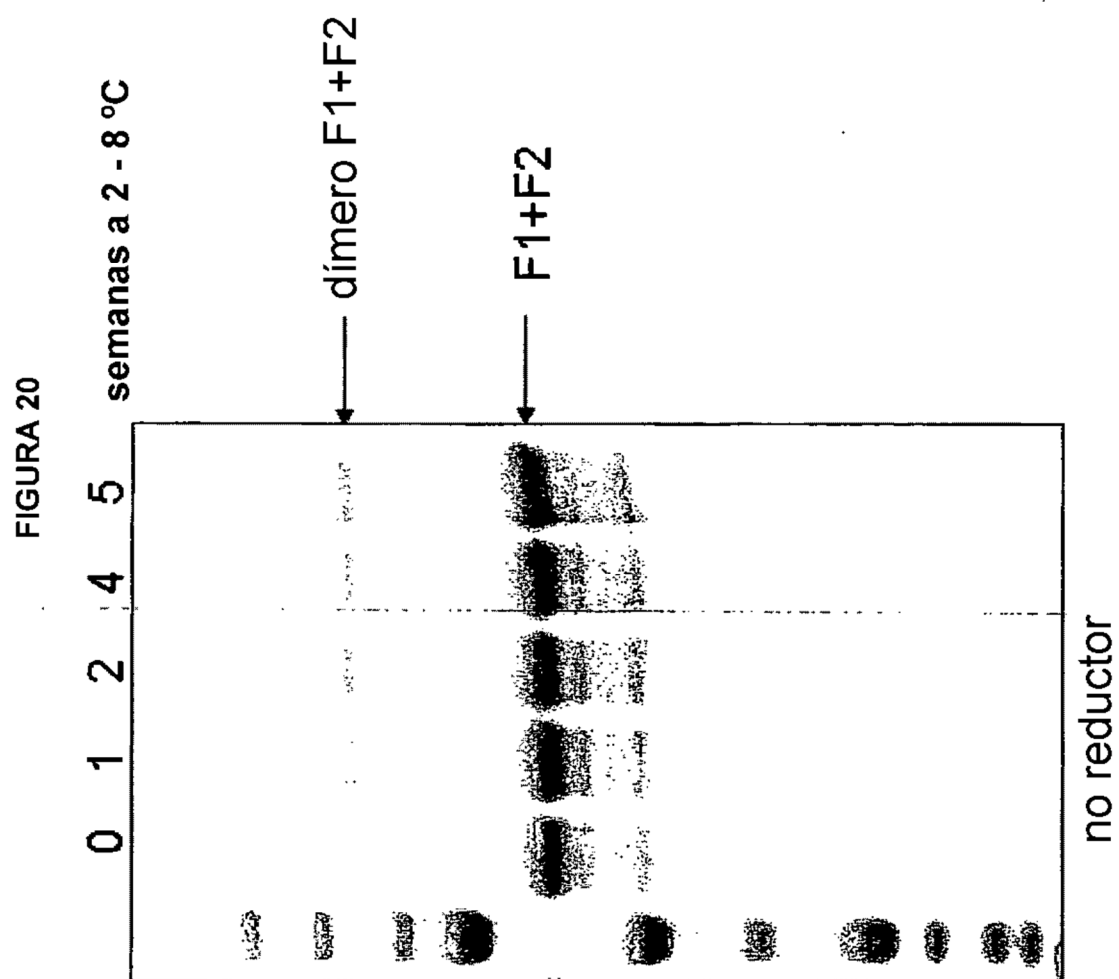


FIGURA 21

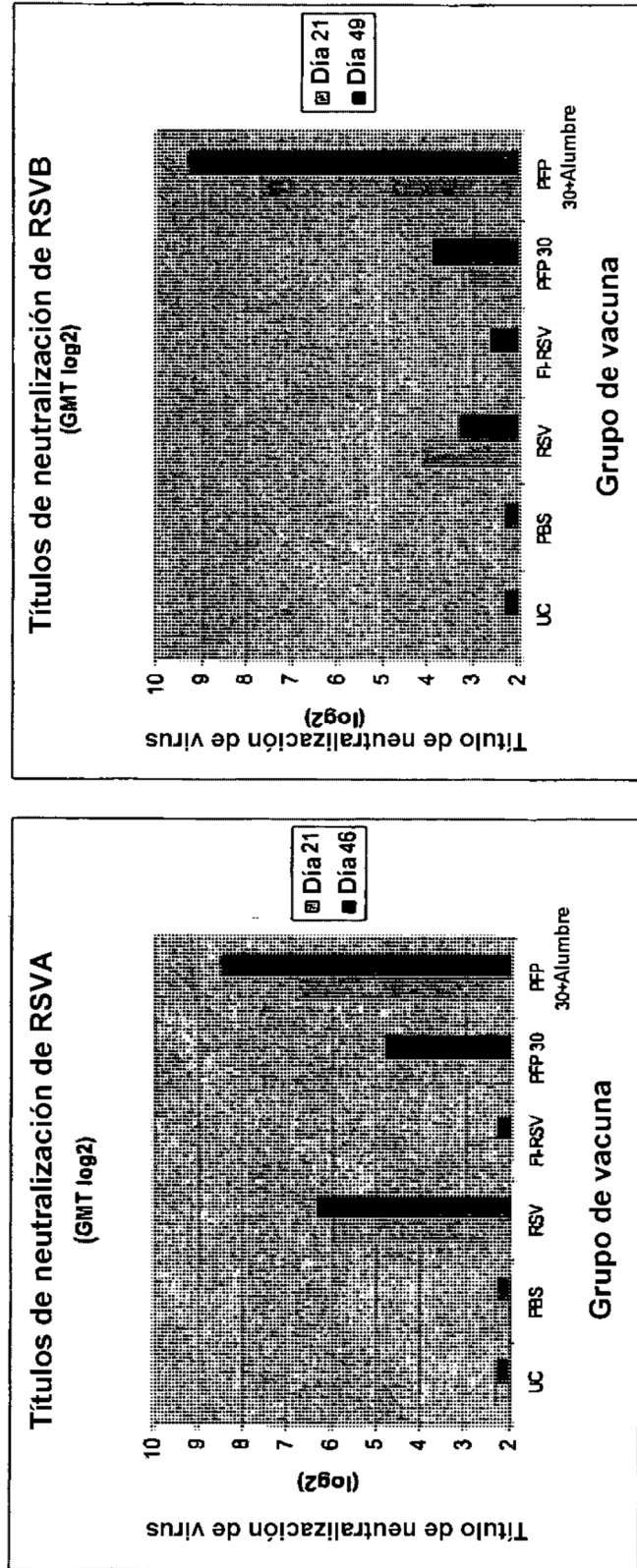
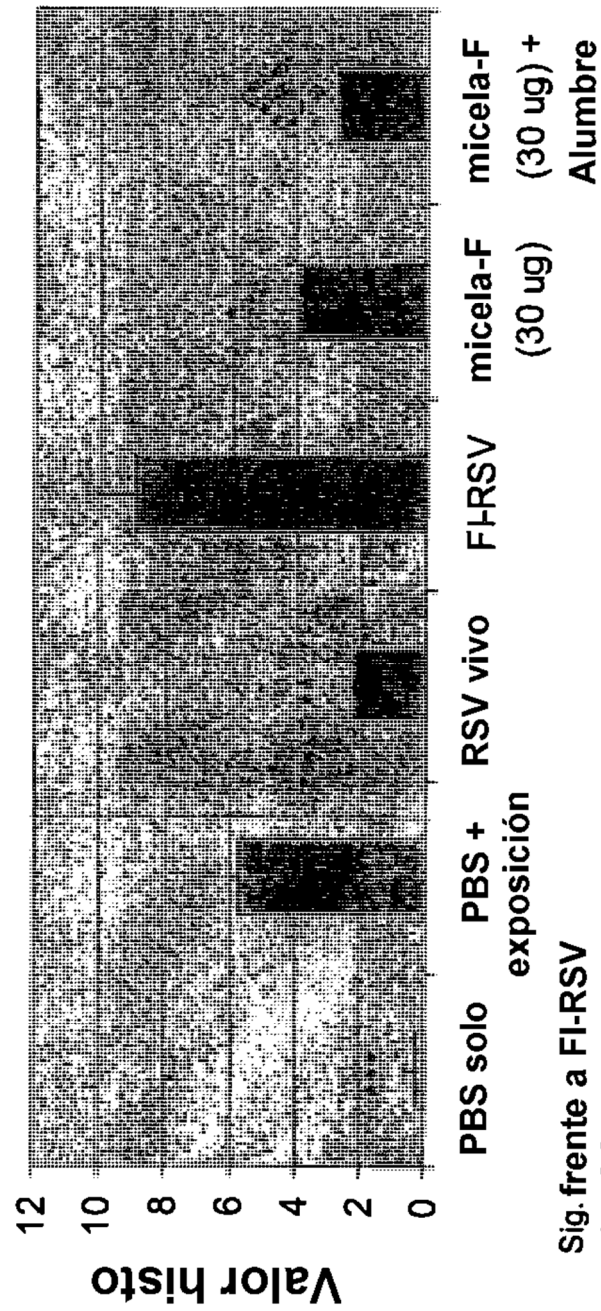


FIGURA 22

Valor de histopatología pulmonar después de exposición a RSV



Sig. frente a FI-RSV

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Grupos de tratamiento