

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 583 257**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10724879 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2445526**

(54) Título: **Antígenos recombinantes del VSR**

(30) Prioridad:

24.06.2009 US 219964 P
13.05.2010 US 334568 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2016

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE y
ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC
(50.0%)

(72) Inventor/es:

BAUDOUX, GUY JEAN MARIE FERNAND
PIERRE;
BLAIS, NORMAND;
CYR, SONYA L;
RHEAULT, PATRICK y
RUELLE, JEAN LOUIS

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 583 257 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

Antígenos recombinantes del VSR

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de las fechas de presentación iniciales de las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos 61/334.568, presentada el 13 de mayo de 2010 y 61/219.964, presentada el 24 de junio de 2009.

Antecedentes

La presente divulgación se refiere al campo de la inmunología. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a composiciones y procedimientos para provocar una respuesta inmune específica para el Virus Sincitrial Respiratorio (VSR).

10 El Virus Sincitrial Respiratorio (VSR) es la causa más común en todo el mundo de infecciones del tracto respiratorio inferior (LRI) en niños con menos de 6 meses de edad y bebés prematuros con un periodo de gestación inferior o igual a 35 semanas. El espectro de enfermedad por VSR incluye una amplia gama de síntomas respiratorios desde rinitis y otitis a neumonía y bronquiolitis, las últimas dos enfermedades estando asociadas con morbilidad y mortalidad considerables. Los seres humanos son el único reservorio conocido para el VSR. La propagación del virus a partir de secreciones nasales contaminadas se produce a través de gotitas respiratorias grandes, se necesita un contacto muy cercano con un individuo infectado o superficie contaminada para su transmisión. El VSR puede persistir durante varias horas en juguetes u otros objetos, lo que explica la tasa elevada de infecciones nosocomiales por VSR, en particular en salas de pediatría

20 Se calcula que las cifras de mortalidad e infección anuales globales para el VSR son de 64 millones y 160.000 millones respectivamente. Solamente en Estados Unidos se calcula que el VSR es responsable de 18.000 a 75.000 hospitalizaciones y de 90 a 1.900 muertes al año. En climas templados, el VSR está bien documentado como una causa de epidemias anuales de comienzos del invierno de LRI agudas, incluyendo bronquiolitis y neumonía. En Estados Unidos, casi todos los niños han sido infectados con VSR hacia los dos años de edad. La tasa de incidencia de LRI asociada con VSR en niños por lo demás sanos se calculó como 37 de cada 1000 niños al año en los primeros dos años de vida (45 por cada 1000 niños al año en los lactantes menores de 6 meses de edad) y el riesgo de hospitalización como 6 de cada 1000 niños al año (por 1000 niños al año en los primeros seis meses de vida). La incidencia es mayor en los niños con enfermedad cardiopulmonar y en los que nacen de forma prematura, que constituyen casi la mitad de las hospitalizaciones relacionadas con el VSR en Estados Unidos. Los niños que experimentan una LRI más severa causada por el VSR más tarde tienen una mayor incidencia de asma infantil.

25 Estos estudios demuestran una necesidad generalizada de vacunas para el VSR, así como el uso de las mismas, en países industrializados, en los que los costos del cuidado de los pacientes con LRI severa y sus secuelas son sustanciales. El VSR también se reconoce cada vez más como una causa importante de morbilidad enfermedades similares a la gripe en los ancianos.

30 En esfuerzos para producir una vacuna para el VSR segura y eficaz y que produzca respuestas inmunes duraderas y protectoras en poblaciones sanas y en riesgo se han intentado diversos enfoques. Sin embargo, ninguna de las candidatas evaluadas hasta la fecha ha demostrado ser segura ni eficaz como una vacuna para evitar la infección por el VSR y/o reducir o prevenir la enfermedad por el VSR, incluyendo infecciones del tracto respiratorio inferior (LRI).

Sumario

35 La presente invención se refiere a un antígeno del virus sincitrial respiratorio recombinante (VSR) que comprende un polipéptido de la proteína F del VSR sin un dominio transmembrana, que comprende un dominio F₂ y un dominio F₁ de un polipéptido de la proteína F del VSR, en el que el polipéptido de la proteína F comprende al menos una modificación que aumenta la glicosilación, al menos una modificación que aumenta la glicosilación comprende una sustitución en la que los aminoácidos que corresponden a las posiciones 500-502 de la SEQ ID NO: 2 se seleccionan entre: NGS; NGT, a una composición inmunogénica que comprende el antígeno del VSR recombinante, un ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno del VSR recombinante y el uso de cualquiera de estos como un medicamento. Como tal, la presente divulgación se refiere a antígenos del virus sincitrial respiratorio recombinantes (VSR). De forma más específica, la presente divulgación se refiere a antígenos que incluyen una proteína F recombinante que se ha modificado para estabilizar la conformación de prefusión trimérica. Los antígenos recombinantes desvelados presentan una inmunogenicidad superior, y se usa en reforma particularmente favorable como componentes de composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) para protección frente a infección y/o enfermedad por el VSR. También se desvelan ácidos nucleicos que codifican los antígenos recombinantes, composiciones inmunogénica se contienen los antígenos, y procedimientos para producir y usar los antígenos.

Breve descripción de las figuras

- La FIG. 1A es una ilustración esquemática que resalta las características estructurales de la proteína F del VSR.
- La FIG. 1B es una ilustración esquemática de antígenos de Prefusión F (PreF) del VSR a modo de ejemplo.
- La FIG. 2 es un gráfico de líneas que ilustra resultados representativos de análisis de fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AFF-MALS) de PreF.
- La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de neutralización de suero humano con antígeno PreF.
- Las FIGS. 4A y B son gráficos de barras que muestran titulaciones de IgG en suero provocadas en ratones como respuesta al antígeno PreF.
- Las FIGS. 5A y B son gráficos de barras que ilustran titulaciones de anticuerpos de neutralización específicos para el VSR provocados por el antígeno PreF.
- Las FIGS. 6A y B son gráficos que indican protección frente a estimulación proporcionada por el antígeno PreF del VSR en ratones.
- La FIG. 7 es un gráfico que evalúa leucocitos BAL después de inmunización y estimulación.
- La FIG. 8 es un gráfico de barras que ilustra IgG en suero provocada después de inmunización con PreF formulado con diluciones de una emulsión de aceite en agua (AS03).
- La FIG. 9 es un gráfico de barras que ilustra titulaciones de anticuerpo de neutralización después de inmunización con PreF formulado con diluciones de una emulsión de aceite en agua (AS03).
- La FIG. 10 es un gráfico que ilustra protección frente a la estimulación después de inmunización con PreF formulado con diluciones de una emulsión de aceite en agua (AS03).

Descripción detallada**INTRODUCCIÓN**

El desarrollo de vacunas para prevenir la infección por el VSR se ha complicado por el hecho de que parece que algunas respuestas inmunes del hospedador desempeñan un papel en la patogénesis de la enfermedad. Algunos estudios iniciales en la década de 1960 mostraban que algunos niños vacunados con una vacuna de VSR inactivado con formalina padecían enfermedades más graves después de la exposición al virus en comparación con sujetos de control sin vacunar. Estos ensayos iniciales dieron como resultado la hospitalización de un 80 % de vacunados y dos muertes. El aumento de la gravedad de la enfermedad se ha reproducido en modelos animales y se cree que resulta de niveles inadecuados de anticuerpos de neutralización de suero, falta de inmunidad local, e inducción excesiva de una respuesta inmune similar a la de los linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Th2) con eosinofilia pulmonar y aumento de la producción de citoquinas IL-4 y IL-5. Por el contrario, una vacuna satisfactoria que protege frente a la infección por el VSR induce una respuesta inmune desviada hacia Th1, caracterizada por la producción de IL-2 e interferón y (IFN).

La presente invención se refiere a un antígeno del virus sincitio respiratorio (VSR) recombinante que comprende un polipéptido de la proteína F del VSR sin un dominio transmembrana que comprende un dominio F₂ y un dominio F₁ de un polipéptido de la proteína F del VSR, en el que el polipéptido de la proteína F comprende al menos una modificación que aumenta la glicosilación, al menos una modificación que aumenta la glicosilación comprende una sustitución en la que los aminoácidos que corresponden a las posiciones 500-502 de la SEQ ID NO: 2 se seleccionan entre: NGS; NGT. La presente divulgación se refiere a antígenos del virus sincitio respiratorio (VSR) recombinantes que resuelven los problemas encontrados con antígenos del pude ser rehusados anteriormente en vacunas, y mejoran las propiedades inmunológicas así como de fabricación del antígeno. Los antígenos del VSR recombinantes desvelados en el presente documento implican un análogo de la proteína Fusión (F) que incluye un polipéptido de la proteína F soluble, que se ha modificado para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F, es decir, la conformación de la proteína F ensamblada madura antes de la fusión con la membrana de la célula hospedadora. Estos análogos de la proteína F se denominan "PreF" o "antígenos PreF", por cuestiones de claridad y simplicidad. Los antígenos PreF desvelados en el presente documento se basan en el descubrimiento inesperado de que algunos análogos de la proteína F soluble que se han modificado por la incorporación de un dominio de trimerización heterólogo presentan características inmunogénicas mejoradas, y son seguros y altamente protectores cuando se administran a un sujeto *in vivo*. En el presente documento se proporcionan algunos detalles de la estructura de la proteína F del VSR con referencia a terminología y denominaciones ampliamente aceptadas en la técnica, y se ilustran de forma esquemática en la FIG. 1A. Una ilustración esquemática de algunos antígenos PreF a modo de ejemplo se proporciona en la FIG. 1B. Los expertos en la materia entenderán que cualquier proteína F del VSR se puede modificar para estabilizar la conformación de prefusión de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por lo tanto, para facilitar la comprensión de los principios que guían la

producción de antígenos PreF, algunos componentes estructurales individuales se indicarán con referencia a una proteína F a modo de ejemplo, cuyas secuencias de polinucleótidos y aminoácidos se proporcionan en las SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. De forma análoga, cuando sea aplicable, se describen antígenos de proteína G en referencia a una proteína G a modo de ejemplo, cuyas secuencias de polinucleótidos y aminoácidos se proporcionan en las SEQ ID NOS: 3 y 4, respectivamente.

Con referencia a la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido de la proteína F (FIG. 1A), los siguientes términos se usan para describir características estructurales de los antígenos PreF.

El término F0 se refiere a un precursor de la proteína F traducido de longitud completa. El polipéptido F0 se puede subdividir en un dominio F₂ y un dominio F₁ separados por un péptido de intervención, denominado pep27. Durante la maduración, el polipéptido F0 se somete a escisión proteolítica en dos sitios de furina situados entre F₂ y F₁ y flanqueando a Pep27. Con fines de discusión que sigue a continuación, un dominio F₂ incluye tanto como todos, de los aminoácidos 1-109, y una parte soluble de un dominio F₁ incluye hasta todos, de los aminoácidos 137-526 de la proteína F. Como se ha indicado anteriormente, estos posiciones de los aminoácidos (y todas las posiciones de los aminoácidos posteriores mencionados en el presente documento) se dan en referencia al polipéptido precursor de la proteína F a modo de ejemplo (F0) de la SEQ ID NO: 2.

El antígeno de prefusión F (o "PreF") es un análogo de la proteína F soluble (es decir, no unido a la membrana) que incluye al menos una modificación que estabiliza la conformación de prefusión de la proteína F, de modo que el antígeno del VSR retiene al menos un epítopo inmunodominante de la conformación de prefusión de la protein F. El polipéptido de la proteína F soluble incluye un dominio F₂ y un dominio F₁ de la proteína F del VSR (pero no incluye un dominio transmembrana de la proteína F del VSR). En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio F₂ incluye aminoácidos 26-105 y el dominio F₁ incluye los aminoácidos 137-516 de una proteína F. De forma análoga, los polipéptidos incluyen componentes estructurales adicionales siempre y cuando los componentes adicionales no alteren la conformación tridimensional, o de otro modo influyan de forma adversa en la estabilidad, producción o procesamiento, o disminución de la inmunogenicidad del antígeno. Los dominios F₂ y F₁ están situados en una orientación de N-terminal a C-terminal diseñada para replicar el plegamiento y ensamblaje del análogo de la proteína F en la conformación de prefusión madura. Para aumentar la producción, el dominio F₂ puede ir precedido por un péptido señal secretor, tal como un péptido señal de la proteína F nativo o un péptido señal heterólogo elegido para aumentar la producción y secreción en las células hospedadoras en las que se va a expresar el antígeno de PreF recombinante.

Los antígenos de PreF se pueden estabilizar (en la conformación de prefusión trimérica) mediante la introducción de una o más modificaciones, tales como la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos. Una modificación de estabilización de este tipo es la adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de estabilización heterólogo. En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio de estabilización heterólogo es un dominio de multimerización de proteína. Un ejemplo particularmente favorable de un dominio de multimerización de proteína de este tipo es un dominio de bucles superenrollados, tal como un dominio de cremallera de isoleucina que estimula la trimerización de múltiples polipéptidos que tienen un dominio de este tipo. Un dominio de cremallera de isoleucina a modo de ejemplo se representa en la SEQ ID NO: 11. Por lo general, el dominio de estabilización heterólogo está situado en posición C-terminal con respecto al dominio F₁.

Opcionalmente, el dominio de multimerización está conectado con el dominio F₁ a través de una secuencia de engarce de aminoácidos corta, tal como la secuencia GG. El engarce también puede ser un engarce más largo (por ejemplo, que incluye la secuencia GG, tal como la secuencia de aminoácidos: GGSGGSGGS; SEQ ID NO: 14). En la técnica se conocen numerosos engarces conformacionalmente neutros que se pueden usar en este contexto sin interrumpir la conformación del antígeno de PreF.

Otra modificación de estabilización es la eliminación de un sitio de reconocimiento y escisión de furina que está situado en los dominios F₂ y F₁ en la proteína F0 nativa. Uno o ambos sitios de reconocimiento de furina, situados en las posiciones 105-109 y en las posiciones 133-136 se pueden eliminar mediante su presión o sustitución de uno o más aminoácidos de los sitios de reconocimiento de furina, de modo que la proteasa es incapaz de escindir el polipéptido PreF en sus dominios componentes. Opcionalmente, el péptido pep27 de intervención también se puede retirar o sustituir, por ejemplo, mediante un péptido de engarce. Además, u opcionalmente, un sitio de escisión que no es furina (por ejemplo, un sitio de metaloproteinasa en las posiciones 112-113) en proximidad con el péptido de fusión se puede retirar o sustituir. Otra mutación de estabilización puede incluir la adición o supresión de un aminoácido hidrófilo en un dominio hidrófobo de la proteína F. Por lo general, un aminoácido cargado, tal como lisina, se añadirá o sustituirá para un resto neutro, tal como leucina, en la región hidrófoba. Por ejemplo, un aminoácido hidrófilo se puede añadir a, o sustituir por, un aminoácido hidrófobo o neutro dentro del dominio de bucles superenrollados HRB del dominio extracelular de la proteína F. En una realización, un resto de aminoácido cargado, tal como lisina, se puede sustituir por la leucina presente en la posición 512 de la proteína F. Como alternativa, o además, un aminoácido hidrófilo se puede añadir a, o sustituido por, un aminoácido hidrófobo o neutro dentro del dominio HRA de la proteína F. Por lo tanto, en una realización adicional uno o más aminoácidos cargados, tales como lisina, se pueden insertar en o cerca de la posición 105-106 (por ejemplo, después del aminoácido que corresponde al resto 105 de la SEQ ID NO: 2 de referencia, tal como entre los aminoácidos 105 y 106) del antígeno de PreF).

Opcionalmente, los aminoácidos hidrófilos se pueden añadir o sustituir en los dominios tanto HRA como HRB. Como alternativa, uno o más restos hidrófobos se pueden suprimir, siempre y cuando la conformación global del antígeno de PreF no se vea afectada de forma adversa.

De acuerdo con la presente invención, se realizan una o más modificaciones, que aumentan el estado de glicosilación del antígeno de PreF. Los aminoácidos en un sitio de glicosilación presentes en una proteína F del VSR

nativa, en el resto 500 del aminoácido (en comparación con la SEQ ID NO: 2) se sustituyen para aumentar el estado de glicosilación del antígeno de PreF. Por lo tanto, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 500-502 de la SEQ ID NO: 2 se pueden seleccionar entre: NGS; NGT. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los antígenos de PreF incluyen un polipéptido de la proteína F soluble que comprende un dominio F₂ (por ejemplo, que corresponde a los aminoácidos 26-105 de la SEQ ID NO: 2) y un dominio F₁ (por ejemplo, que corresponde a los aminoácidos 137-516 de la SEQ ID NO: 2) de un polipéptido de la proteína F del VSR, en los que se ha introducido al menos una modificación que altera la glicosilación. El antígeno de PreF del VSR, por lo general incluye un péptido de fusión intacto entre el dominio F₂ y el dominio F₁. Opcionalmente, el antígeno de PreF incluye un péptido señal.

Como se ha desvelado anteriormente, tales polipéptidos de la proteína F pueden incluir al menos una modificación seleccionada entre: (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo (tal como un dominio de cremallera de isoleucina); (ii) una adición, supresión o sustitución de aminoácidos que elimina un sitio de escisión de furina en una posición que corresponde a los aminoácidos 105-109, una posición que corresponde a los aminoácidos 133-136, o en ambas posiciones que corresponden a los aminoácidos 105-109 y 133-136 del precursor de referencia de la proteína F (F₀) de la SEQ ID NO: 2; (iii) una supresión de uno o más del dominio pep27; y (iv) al menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrófilo en un dominio hidrófobo del dominio extracelular de la proteína F por sustitución de lisina por la leucina presente en la posición 512 o adición de una lisina después del aminoácido que corresponde al resto 105 de la SEQ ID NO: 2 de referencia. Como se ha desvelado anteriormente, tales antígenos de PreF del VSR modificados por glicosilación en multímeros, por ejemplo, trímeros.

En realizaciones a modo de ejemplo, los antígenos de PreF modificados por glicosilación se seleccionan entre el grupo de: a) un polipéptido que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 22; b) un polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 21 o por una secuencia de polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas sustancialmente sobre toda su longitud con la SEQ ID NO: 21; c) un polipéptido con una identidad de secuencias de al menos un 95 % con la SEQ ID NO: 22.

Cualquiera y/o todas las modificaciones de estabilización se pueden usar de forma individual y/o en combinación con cualquiera de las otras modificaciones de estabilización desveladas en el presente documento para producir un antígeno de PreF. En realizaciones a modo de ejemplo, la proteína de PreF que comprende un polipéptido que comprende un dominio F₂ y un dominio F₁, sin sitio de escisión de furina de intervención entre el dominio F₂ y el dominio F₁, y con un dominio de estabilización heterólogo (por ejemplo, dominio de trimerización) se sitúa en posición C-terminal con respecto al dominio F₁. En determinadas realizaciones, el antígeno de PreF también incluye una o más adiciones y/o sustituciones de un resto hidrófilo en un dominio hidrófobo como se ha indicado anteriormente. Opcionalmente, el antígeno de PreF tiene una modificación de al menos un sitio de escisión que no es furina, tal como un sitio de metaloproteinasa.

Opcionalmente, cualquier antígeno de PreF descrito anteriormente puede incluir una secuencia adicional que sirve como una ayuda en la purificación. Un ejemplo, es una etiqueta de polihistidina. Una etiqueta de este tipo se puede retirar del producto final si se desea. Cuando se expresan, los antígenos de PreF se someten a plegamiento intramolecular y se ensamblan en proteína madura que incluye un multímero de polipéptidos. De forma favorable, los polipéptidos del antígeno de PreF se ensamblan en un trímero que se parece a la conformación de prefusión de la proteína F del VSR, procesada, madura.

Cualquiera de los antígenos de PreF desvelados en el presente documento se puede usar de forma favorable en composiciones inmunogénicas con el fin de provocar una respuesta inmune protectora frente al VSR. Tales composiciones inmunogénicas por lo general incluyen un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón. Para mejorar la respuesta inmune producida después de la administración, la composición inmunogénica por lo general también incluye un adyuvante. En el caso de composiciones inmunogénicas para provocar una respuesta inmune frente al VSR (por ejemplo, vacunas), las composiciones favorables incluyen un adyuvante que predominantemente provoca una respuesta inmune a Th1 (una adyuvante de desviación hacia Th1). Por lo general, el adyuvante se selecciona para que sea adecuado para administración a la población diana a la que se va a administrar la composición. Por lo tanto, dependiendo de la aplicación, el adyuvante se selecciona para que sea adecuado para administración, por ejemplo, a neonatos con las personas de mayor edad.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento se usan de forma favorable como vacunas para la reducción o prevención de infección con VSR, sin inducir una respuesta patológica (tal como enfermedad viral potenciada con vacuna) después de administración o exposición al VSR.

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también pueden incluir al menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto del VSR. Por ejemplo, el organismo patógeno es un virus distinto del VSR, tal como virus de la Parainfluenza (PIV), sarampión, hepatitis B, poliovirus, o virus de la gripe. Como alternativa, el organismo patógeno puede ser una bacteria, tal como difteria, tétanos, pertussis, *Haemophilus influenzae*, y *Pneumococcus*. Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de los antígenos de PreF también son una característica de la presente divulgación. La secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico que codifica el antígeno de PreF del ácido nucleico se puede optimizar para expresión en un hospedador seleccionado (tal como células CHO, otras células de mamífero, o células de insecto). Por consiguiente, los vectores, incluyendo vectores de expresión (que incluyen vectores de expresión procariotas y eucariotas) son una característica de la presente divulgación. De forma análoga, las células hospedadoras que incluyen tales ácidos nucleicos, y vectores, son una característica de la presente divulgación. Tales ácidos nucleicos también se pueden usar en el contexto de

composiciones inmunogénica para administración a un sujeto para provocar una respuesta inmune específica para el VSR Los antígenos de PreF se usan de forma favorable para la prevención y/o tratamiento de infección por el VSR. Por lo tanto, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para provocar una respuesta inmune frente al VSR. El procedimiento implica la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que contiene un antígeno de PreF a un sujeto (tal como un sujeto humano o animal). La administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición provoca una respuesta inmune específica para epítopo presentes en el antígeno de PreF. Tal respuesta inmune puede incluir respuestas de linfocitos B (por ejemplo, la producción de anticuerpos de neutralización) y/o respuestas de linfocitos T (por ejemplo, la producción de citoquinas). De forma favorable, la respuesta inmune provocada por el antígeno de PreF incluye elementos que son específicos para al menos un epitopo conformacional presente en la conformación de prefusión de la proteína F del VSR Los antígenos y composiciones de PreF se pueden administrar a un sujeto sin aumentar una enfermedad viral después del contacto con el VSR De forma favorable, los antígenos de PreF desvelados en el presente documento y composiciones inmunogénicas formuladas de forma adecuada provocan una respuesta inmune desviada hacia Th1 que reducir o previene la infección con un VSR y/o reduce o previene una respuesta patológica después de infección con un VSR.

Las composiciones inmunogénica se pueden administrar a través de una diversidad de vías, incluyendo vías tales como intranasal, que colocan directamente el antígeno de PreF en contacto con la mucosa del tracto respiratorio superior. Como alternativa, se pueden usar algunas vías de administración más tradicionales, tal como una vía de administración intramuscular.

Por lo tanto, también se contempla el uso de cualquiera de los antígenos del VSR (o ácidos nucleicos) desvelados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de infección por VSR (por ejemplo, tratamiento de forma profiláctica o prevención de una infección por VSR). Por consiguiente, la presente divulgación proporciona los antígenos del VSR recombinantes desvelados o las composiciones inmunogénicas para uso en medicina, así como el uso de los mismos para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con el VSR.

Algunos detalles adicionales con respecto a antígenos de PreF, y procedimientos para su uso, se presentan en la descripción y ejemplos que siguen a continuación.

TÉRMINOS

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos. Algunos términos y explicaciones adicionales se pueden proporcionar en el contexto de la presente divulgación.

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Algunas definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y col., (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos en singular "un", "uno", y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma análoga, el término "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto no indique claramente de otro modo. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Se debe entender adicionalmente que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, dados para ácidos nucleicos o polipéptido son aproximados, y se proporcionan para descripción. Además, se pretende que las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, sean aproximadas. Por lo tanto, cuando se indica que una concentración es al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que se entienda que la concentración es al menos aproximadamente (o "aproximadamente" o "≈") 200 pg.

Aunque en la práctica o ensayo de la presente divulgación se pueden usar algunos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se proporcionan algunos procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" se refiere a "incluye". Por lo tanto, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que el término "comprende", y variaciones tales como "comprender" y "que comprende" implica la inclusión de un compuesto o composición indicados (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro compuesto, composición, etapa o grupo de los mismos. La abreviatura, "por ejemplo" se deriva del latín *exempli gratia*, y en el presente documento se usa para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto, la abreviatura "e.g." es sinónima con el término "por ejemplo".

El virus sincitial respiratorio (VSR) es un virus patógeno de la familia Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género Pneumovirus. El genoma del VSR es una molécula de ARN de sentido negativo, que codifica 11 proteínas. Una asociación estrecha del genoma del ARN con la proteína N viral forma una nucleocápside encuentra dentro de la envoltura viral. Se han descrito dos grupos de cepas del VSR humano, los grupos A y B, basándose en las diferencias de antigenicidad de la glicoproteína G. Hasta la fecha se han aislado numerosas cepas del VSR. Algunas cepas a modo de ejemplo indicadas con número de referencia en GenBank y/o EMBL se pueden encontrar en el

documento WO2008114149, que desvela las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de las proteínas F y G del VSR adecuadas para puso en antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G químéricos), y en combinaciones con antígenos PreF. Probablemente se van a aislar algunas cepas de VSR adicionales, y están incluidas dentro del género del VSR. De forma análoga, el género del VSR incluye variantes que se producen a partir de origen natural (por ejemplo, cepas identificadas previa o posteriormente) mediante deriva genética, o síntesis artificial y/o recombinación.

El término "proteína F" o "proteína de Fusión" o "polipéptido de la proteína F" o "polipéptido de proteína de Fusión" se refiere a un polipéptido o proteína que tiene toda o parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de proteína de Fusión del VSR. Se han descrito numerosas proteínas de Fusión del VSR y son conocidas por los expertos en la materia. El documento WO2008114149 expone algunas variantes de la proteína F a modo de ejemplo (por ejemplo, variantes de origen natural) disponibles al público a partir de la fecha de presentación de la presente divulgación.

Una "variante" cuando se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido (por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido de la proteína F del VSR, o un ácido nucleico o polipéptido PreF) es un ácido nucleico o un polipéptido que se diferencia de un ácido nucleico o polipéptido de referencia. Normalmente, la diferencia(s) entre el ácido nucleico o polipéptido variante y de referencia constituye un número de diferencias proporcionalmente pequeño en comparación con el referente.

Un "dominio" de un polipéptido o proteína es un elemento definido estructuralmente dentro del polipéptido o proteína. Por ejemplo, un "dominio de trimerización" es una secuencia de aminoácidos dentro de un polipéptido que estimula el ensamblaje del polipéptido en trímeros. Por ejemplo, un dominio de trimerización estimular el ensamblaje en trímeros mediante asociaciones con otros dominios de trimerización (de polipéptidos adicionales con la misma secuencia de aminoácidos o una diferente). El término también se usa para hacer referencia a un polinucleótido que codifica un péptido o polipéptido de este tipo.

Los términos "nativo" y "de origen natural" se refieren a un elemento, tal como una proteína, polipéptido o ácido nucleico, que está presente en el mismo estado que en el que se encuentra en la naturaleza. Es decir, el elemento no se ha modificado artificialmente. Se entenderá, que en el contexto de la presente divulgación, existen numerosas variantes nativas/de origen natural de proteínas o polipéptidos del VSR, por ejemplo, obtenidas a partir de diferentes cepas o aislados del VSR de origen natural.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son restos de aminoácidos que están unidos en conjunto a través de enlaces amida. Los términos "polipéptido" o "proteína" cómo se usan en el presente documento pretenden incluir cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glicoproteínas. El término "polipéptido" pretende cubrir de forma específica proteínas de origen natural, así como las que se producen de forma recombinante o sintética. El término "fragmento", en referencia a un polipéptido, se refiere a una parte (es decir, una subsecuencia) de un polipéptido. La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que retienen al menos un epítopo inmunogénico predominante de la proteína polipéptido de referencia de longitud completa. La orientación dentro de un polipéptido se menciona por lo general de una dirección N-terminal a C-terminal, definida por la orientación de los restos amino y carboxi de los aminoácidos individuales. Los polipéptido se traducen desde el extremo N o amino hacia el extremo C o carboxi.

Un "péptido señal" es una secuencia corta de aminoácidos (por ejemplo, una longitud de aproximadamente 18-25 aminoácidos) que dirige proteínas secretoras o de membrana recién sintetizadas a y a través de membranas, por ejemplo, del retículo endo plasmático. Los péptidos señal se sitúan frecuentemente, pero no universalmente en el extremo N-terminal de un polipéptido, y frecuentemente se extinguen con peptidasas señal después de que la proteína haya atravesado la membrana. Las secuencias señal por lo general contienen tres características estructurales comunes: una región básica polar N-terminal (región n), un núcleo hidrófobo, y una región c hidrófila.

Los términos "polinucleótido" y "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a una forma polimérica de nucleótidos con una longitud de al menos 10 bases. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o formas modificadas de cualquier nucleótido. El término incluye formas individuales y dobles de ADN. Por "polinucleótido aislado" se hace referencia a un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo con ambas secuencias de codificación con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo en la posición 5' y otra en el extremo en la posición 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se deriva. En una realización, un polinucleótido codifica un polipéptido. La dirección en las posiciones 5' y 3' de un ácido nucleico se define por referencia a la conectividad de unidades de nucleótidos individuales, y se nombra de acuerdo con las posiciones del carbono del anillo de azúcar desoxirribosa (o ribosa). El contenido de información (codificación) de una secuencia de polinucleótidos se lee en una dirección desde la posición 5' a la posición 3'.

Un ácido nucleico "recombinante" es uno que tiene una secuencia que no tiene origen natural o tiene una secuencia que se fabrica mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial se puede realizar mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Una proteína "recombinante" es una que esta codificada por un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante),

que se ha introducido en una célula hospedadora, tal como una célula bacteriana o eucariota. El ácido nucleico se puede introducir en un vector de expresión que tiene señales capaces de expresar la proteína codificada por el ácido nucleico introducido o el ácido nucleico se puede integrar en el cromosoma de la célula hospedadora.

5 El término "heterólogo" con respecto a un ácido nucleico, un polipéptido u otro componente celular, indica que el componente se produce cuando no se encuentra normalmente en la naturaleza y/o que se origina a partir de una fuente o especie diferentes.

El término "purificación" (por ejemplo, con respecto a un patógeno o una composición que contiene un patógeno) se refiere al procedimiento para retirar componentes de una composición, cuya presencia no se desea. Purificación es un término relativo, y no requiere que todas las trazas del componente no deseado se retiren de la composición. En 10 el contexto de producción de vacunas, purificación incluye procedimientos tales como centrifugación, diálisis, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de exclusión por tamaño, purificación por afinidad o precipitación. Por tanto, el término "purificado" no requiere una pobreza absoluta; en su lugar, se pretende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de ácido nucleico purificado es una en la que la proteína 15 especificada está más enriquecida de lo que el ácido nucleico lo está en su entorno generativo, por ejemplo, dentro de una célula o en una cámara de reacción bioquímica. Una preparación de ácido nucleico o proteína sustancialmente puros se debe purificar de modo que el ácido nucleico deseado represente al menos un 50 % del contenido total de ácido nucleico en la preparación. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico sustancialmente puro representará al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % o más del contenido total de ácido nucleico o proteína de la preparación.

20 Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína u orgánulo) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se produce de forma natural, tal como, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Algunos ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos convencionales de purificación. El término también incluye ácidos nucleicos y proteínas 25 preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora así como ácidos nucleicos y proteínas sintetizados químicamente.

Un "antígeno" es un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos y/o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan, absorben o de otro modo se introducen en un animal. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigenicos relacionados. El término "epítopo" o "determinante antigenico" se refiere a un sitio en un antígeno a qué responden los linfocitos B y/o T. Los "epítopos antigenicos dominantes" o "epítopo dominante" son los epítopos a los que se fabrica una respuesta inmune al hospedador funcionalmente significativa, por ejemplo, una respuesta a anticuerpo o una respuesta a linfocitos T. Por lo tanto, con respecto a una respuesta inmune protectora frente a un patógeno, los epítopos antigenicos dominantes son esos restos antigenicos que cuando son reconocidos por el sistema inmune del hospedador dan como resultado protección de enfermedad causada por el patógeno. La expresión "epítopo de linfocitos T" se refiere a un epítopo que cuando se une a una molécula de MHC apropiada se une de forma específica mediante un linfocito T (mediante un receptor de linfocitos T). Un "epítopo de linfocitos B" es un epítopo 35 que se une de forma específica mediante un anticuerpo (o molécula receptora de linfocitos B).

40 Un "adyuvante" es un agente que aumenta la producción de una respuesta inmune de una manera no específica. Algunos adyuvantes comunes incluyen suspensiones de minerales (alum, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) en el que se adsorbe el antígeno; emulsiones, incluyendo emulsiones de agua en aceite, y de aceite en agua (y variantes de las mismas, incluyendo emulsiones dobles y emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimuladores (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas del receptor de tipo Toll (en particular, agonistas TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9), y diversas combinaciones de tales componentes.

45 Una "composición inmunogénica" es una composición de materia adecuada para administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un entorno experimental) que es capaz de provocar una respuesta inmune específica, por ejemplo, frente a un patógeno, tal como VSR. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, antígenos de polipéptido) o epítopos antigenicos. Una composición inmunogénica también 50 puede incluir uno o más componentes adicionales capaces de provocar o aumentar una respuesta inmune, tal como un excipiente, vehículo y/o adyuvante. En ciertos casos, las composiciones inmunogénicas se administran para provocar una respuesta inmune que protege al sujeto frente a síntomas o afecciones inducidas por un patógeno. En algunos casos, los síntomas o enfermedad causados por un patógeno se previenen (o reducen o mejoran) inhibiendo la replicación del patógeno (por ejemplo, VSR) después de exposición del sujeto al patógeno. En el contexto de la presente divulgación, se entenderá que la expresión composición inmunogénica incluye 55 composiciones que están destinadas a administración a un sujeto o población de sujetos con el fin de provocar una respuesta inmune protectora o paliativa frente al VSR (es decir, composiciones de vacuna o vacunas).

Una "respuesta inmune" es una respuesta de una célula del sistema inmune, tal como un linfocito B, linfocito T, o monocito, a un estímulo. Una respuesta inmune puede ser una respuesta de linfocitos B, que da como resultado la 60 producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos de neutralización específicos de antígeno. Una respuesta inmune también puede ser una respuesta de linfocitos T, tal como una respuesta de CD4⁺ o una

5 respuesta de CD8⁺. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno en particular (es decir, una "respuesta específica de antígeno"). Si el antígeno se deriva de un patógeno, la respuesta específica del antígeno es una "respuesta específica de patógeno". Una "respuesta inmune protectora" es una respuesta inmune que inhibe una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce la infección por un patógeno, o disminuye síntomas (incluyendo muerte) que resultan de la infección por el patógeno. Una respuesta inmune protectora se puede medir, por ejemplo, mediante la inhibición de la replicación viral o formación de placas en un ensayo de reducción de placas o ensayo de neutralización de ELISA, o midiendo la resistencia a estimulación de patógenos *in vivo*.

10 Una respuesta inmune desviada hacia "Th1" se caracteriza por la presencia de células auxiliares CD4⁺ T que producen IL-2 e IFN-γ, y por lo tanto, mediante la secreción o presencia de IL-2 e IFN-γ. Por el contrario, una respuesta inmune desviada hacia "Th2" se caracteriza por una preponderancia de células auxiliares CD4⁺ que producen IL-4, IL-5, e IL-13.

15 Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad de una composición (por lo general, una composición inmunogénica) usada para provocar una respuesta inmune en un sujeto a la composición o a un antígeno en la composición. Normalmente, el resultado deseado es la producción de una respuesta inmune específica de antígeno (por ejemplo, patógeno) si es capaz de o que contribuye a la protección del sujeto frente al patógeno. Sin embargo, para obtener una respuesta inmune protectora frente a un patógeno, se pueden necesitar múltiples administraciones de la composición inmunogénica. Por lo tanto, en el contexto de la presente divulgación, la expresión cantidad inmunológicamente eficaz incluye una dosis fraccionaria que contribuye, en combinación con administraciones previas o posteriores, a la obtención de una respuesta inmune protectora.

20 El adjetivo "farmacéuticamente aceptable" indica que el referente es adecuado para administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano o animal). Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15^a Edición (1975), describe composiciones y formulaciones (incluyendo diluyentes) adecuadas para administración farmacéutica de composiciones terapéuticas y/o profilácticas, incluyendo composiciones inmunogénicas.

25 El término "modular" en referencia a una respuesta, tal como una respuesta inmune, significa alterado variar el inicio, magnitud, duración o características de la respuesta. Un agente que modula una respuesta inmune altera al menos uno del inicio, magnitud, duración o características de una respuesta inmune después de su administración, o que altera al menos uno del inicio, magnitud, duración característica en comparación con un agente de referencia.

30 El término "reduce" es un término relativo, de modo que un agente reduce una respuesta o afección si la respuesta o afección disminuye de forma cuantitativa después de la administración del agente, o si disminuye después de la administración del agente, en comparación con un agente de referencia. De forma análoga, el término "previene" no significa necesariamente que una gente elimine completamente la respuesta o afección, siempre y cuando se elimine al menos una característica de la respuesta o afección. Por lo tanto, una composición inmunogénica que renuncia previene una infección o una respuesta, tal como una respuesta patológica, por ejemplo, enfermedad viral 35 potenciada por vacuna, puede, eliminar, pero no necesariamente de forma total, una infección o respuesta, siempre y cuando la infección o respuesta sería disminuida de forma mensurable, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 50 %, tal como en al menos aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o incluso en aproximadamente un 90 % de (es decir, en un 10 % o inferior a) la infección o respuesta en ausencia del agente, o en comparación con un agente de referencia.

40 Un "sujeto" es un organismo vertebrado multicelular vivo. En el contexto de la presente divulgación, el sujeto puede ser un sujeto experimental, tal como un animal no humano, por ejemplo, un ratón, una rata del algodón, o un primate no humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un sujeto humano.

ANTÍGENOS DE PreF

45 En la naturaleza, la proteína F del VSR se expresa como un solo precursor de polipéptido con una longitud de 574 aminoácidos, denominado F0. *In vivo*, F0 se oligomeriza en el retículo endoplasmático y se procesa de forma proteolítica por una furina proteasa en dos secuencias consenso de furina conservadas (sitios de escisión de furina), RARR¹⁰⁹ (SEQ ID NO: 15) y RKRR¹³⁶ (SEQ ID NO: 16) para generar un oligómero que consiste en dos fragmentos unidos por disulfuro. El más pequeño de estos fragmentos se denomina F2 y se origina desde la parte N-terminal del precursor de F0. Los expertos en la materia reconocerán que las abreviaturas F0, F1 y F2 se denominan normalmente F0, F1 y F2 en la bibliografía científica. El fragmento F1 C-terminal más grande ancla la proteína F en la membrana a través de una secuencia de aminoácidos hidrófobos, que son adyacentes a una cola hito plasmática de 24 aminoácidos. Tres dímeros F2-F1 se asocian para formar una proteína F madura, que adopta una conformación prefusogénica ("prefusión") metaestable que se pone en funcionamiento para experimentar un cambio conformacional después de contacto con una membrana de célula diana. Este cambio conformacional expone a una secuencia hidrófoba, conocida como el péptido de fusión, que se asocia con la membrana de la célula hospedadora y estimula la fusión de la membrana del virus, o una célula infectada, con la membrana de la célula diana. 50 El fragmento F1 contiene al menos un dos dominios de repetición heptad, denominados HRA y HRB, y situados en proximidad a los dominios de ancla de péptido de fusión y transmembrana, respectivamente. En la conformación de prefusión, el dímero F2-F1 forma una estructura de cabeza y tallo globular, en la que los dominios HRA están en una

conformación segmentada (extendida) en la cabeza globular. Por el contrario, los dominios HRB forman un tallo de bucles superenrollados de tres hebras que se extienden desde la región de la cabeza. Durante la transición de la prefusión a las conformaciones postfusión, los dominios HRA se colapsan y se ponen en proximidad con los HRB para formar un haz de seis hélices anti-paralelas. En el estado de postfusión, el péptido de fusión y dominios transmembrana se yuxtaponen para facilitar la fusión de la membrana.

Aunque la descripción conformacional proporcionada anteriormente se basa en el modelado molecular de datos cristalográficos, las distinciones estructurales entre las conformaciones de prefusión y postfusión se pueden controlar sin recurrir a la cristalográfica. Por ejemplo, la micrografía electrónica se puede usar para distinguir entre las conformaciones de prefusión y postfusión (como alternativa denominadas prefusogénica y fusogénica), como se demuestra en Calder y col., *Virology*, 271: 122-131 (2000) y Morton y col., *Virology*, 311: 275-288. La conformación de prefusión también se puede distinguir de la conformación fusogénica (postfusión) mediante ensayos de asociación de liposomas como se describe en Connolly y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 17903-17908 (2006). Además, las conformaciones de prefusión y fusogénica se pueden distinguir usando anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que reconocen de forma específica epítopos de conformación presentes en una o la otra de la forma de prefusión o fusogénica de la proteína F del VSR, pero no en la otra forma. Tales epítopos de conformación se pueden deber a la exposición preferente de un determinante antigénico en la superficie de la molécula. Como alternativa, los epítopos conformacionales pueden surgir de la yuxtaposición de aminoácidos que no son contiguos en el polipéptido lineal.

Los antígenos de PreF desvelados en el presente documento están diseñados para estabilizar y mantener la conformación de prefusión de la proteína F del VSR, tal como en una población de proteínas expresadas, una parte sustancial de la población de proteínas expresadas está en la conformación prefusogénica (prefusión) (por ejemplo, como se predice con el modelado estructural y/o termodinámico o como se evalúa con uno o más de los procedimientos desvelados anteriormente). Las modificaciones de estabilización se introducen en una proteína F nativa (o sintética), tal como la proteína F a modo de ejemplo de la SEQ ID NO: 2, de manera que los epítopos inmunogénicos principales de la conformación de prefusión de la proteína F se mantienen después de la introducción del antígeno PreF en un entorno celular o extracelular (por ejemplo, *in vivo*, por ejemplo, después de la administración a un sujeto).

En primer lugar, un dominio de estabilización heterólogo se puede colocar en el extremo C-terminal de la construcción para sustituir la membrana ese ancla al dominio del polipéptido F0. Este dominio de estabilización se predice para compensar la inestabilidad de HRB, para ayudar a estabilizar al confórmero de prefusión. En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio de estabilización heterólogo es un dominio de multimerización de proteínas. Un ejemplo particularmente favorable de un dominio de multimerización de proteínas de este tipo es un dominio de trimerización. Algunos dominios de trimerización a modo de ejemplo se pliegan en bucles superenrollados que estimulan el ensamblaje en trímeros de múltiples polipéptidos que tienen tales dominios de bucles superenrollados. Un ejemplo favorable de un dominio de trimerización es una cremallera de isoleucina. Un dominio de cremallera de isoleucina a modo de ejemplo es la variante de isoleucina GCN4 de levadura modificada por ingeniería descrita en Harbury y col., *Science* 262: 1401-1407 (1993). La secuencia de un dominio de cremallera de isoleucina adecuado se representa por la SEQ ID NO: 11, aunque algunas variantes de esta secuencia que retienen la capacidad para formar dominio de estabilización de bucles superenrollados son igualmente adecuadas. Algunos dominios de trimerización de bucles superenrollados de estabilización alternativos incluyen: TRAF2 (N.º de Referencia en GENBANK® Q12933 [gi:23503103]; aminoácidos 299-348); Thrombospondina 1 (N.º de Referencia P07996 [gi:135717]; aminoácidos 291-314); Matrilina-4 (N.º de Referencia 095460 [gi:14548117]; aminoácidos 594-618; CMP (matriliна-1) (N.º de Referencia NP_002370 [gi:4505111]; aminoácidos 463-496; HSF1 (N.º de Referencia AAX42211 [gi:61362386]; aminoácidos 165-191; y Cubilina (N.º de Referencia NP_001072 [gi:4557503]; aminoácidos 104-138. Se espera que un dominio de trimerización adecuado dé como resultado el ensamblaje de una parte sustancial de la proteína expresada en trímeros. Por ejemplo, al menos un 50 % del polipéptido de PreF recombinante que tiene un dominio de trimerización se ensamblará en un trímero (por ejemplo, cómo se evalúa con AFF-MALS). Por lo general, al menos un 60 %, más favorablemente al menos un 70 %, y de forma más deseada al menos un aproximadamente un 75 % o más del polipéptido expresado existe como un trímero.

Para estabilizar HRB incluso más, el resto de leucina situado en la posición 512 (con respecto a la proteína F0 nativa) del PreF se puede sustituir con una lisina (L482K del polipéptido del antígeno de PreF de la SEQ ID NO: 6). Esta sustitución mejora la periodicidad del resto hidrófobo de bucle superenrollado. De forma análoga, una lisina se puede añadir después del aminoácido en la posición 105.

En segundo lugar, pep27 se puede retirar. El análisis de un modelo estructural de la proteína F del VSR en el estado de prefusión sugiere que pep27 crea un bucle grande sin restricciones entre F1 y F2. este bucle no contribuye a la estabilización del estado de prefusión, y se retira después de escisión de la proteína nativa por la furina.

En tercer lugar, una o ambos de los motivos de escisión de furina se pueden suprimir. Con este diseño, el péptido de fusión no se desciende de F2, evitando la liberación de la cabeza globular del confórmero de prefusión y la accesibilidad a membranas cercanas. Se predice que la interacción entre el péptido de fusión y la superficie de contacto de la membrana es una cuestión importante en la inestabilidad del estado de prefusión. Durante el proceso de fusión, la interacción entre el tejido de fusión y la membrana diana da como resultado la exposición del tejido de fusión desde dentro de la estructura de cabeza globular, aumentando la inestabilidad del estado de prefusión y llegándose en confórmero después de la fusión. Este cambio de conformación permite el proceso de fusión de membrana. Se predice que la retirada de uno o ambos de los sitios de escisión de furina evita la accesibilidad de la membrana a la parte N-terminal del péptido de fusión, estabilizando el estado de prefusión. Por lo tanto, en

realizaciones a modo de ejemplo desveladas en el presente documento, la retirada de los motivos de escisión de furina da como resultado un antígeno de PreF que comprende un péptido de fusión intacto, que no se escinde con la furina durante o después del procesamiento y ensamblaje.

Opcionalmente, al menos un sitio de escisión que no es furina también se puede de retirar, por ejemplo mediante sustitución de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, las evidencias experimentales sugieren que en condiciones que conducen a escisión con ciertas metalo proteinazas, el antígeno de PreF se puede eximir en las proximidades de los aminoácidos 110-118 (por ejemplo, con la escisión produciéndose entre los aminoácidos 112 y 113 del antígeno de PreF; entre una leucina en la posición 142 y glicina en la posición 143 del polipéptido de la proteína F de referencia de la SEQ ID NO: 2). Por consiguiente, la modificación de uno o más aminoácidos dentro de esta región puede reducir la escisión del antígeno de PreF. Por ejemplo, la leucina en la posición 112 se puede sustituir con un aminoácido diferente, tal como isoleucina, glutamina o triptófano (como se muestra en la SEQ ID NO: 20). Como alternativa o adicionalmente, la glicina en la posición 113 se puede sustituir con una serina o alanina.

De acuerdo con la presente invención, un polipéptido de la proteína F del VSR recombinante incluye una o más modificaciones que alteran el patrón o estado de glicosilación (por ejemplo, aumentando la proporción de moléculas glicosiladas en uno de los sitios de glicosilación presentes en un polipéptido de la proteína F nativo. Se predice que el polipéptido de la proteína F nativo de la SEQ ID NO: 2 se va a glicosilada en las posiciones 27, 70 y 500 del aminoácido (correspondientes a las posiciones 27, 70 y 470 del antígeno de PreF de la SEQ ID NO: 6). De acuerdo con la invención, una modificación se introduce en el sitio de glicosilación en la posición 500 del aminoácido (denominado N470)-502 que aumenta la eficacia de la glicosilación en este sitio de glicosilación. Algunos ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen las realizadas en las posiciones 500-502, de las siguientes secuencias de aminoácidos: NGS; NGT. De forma interesante, se ha encontrado que algunas modificaciones de este sitio de glicosilación que dan como resultado el aumento de la glicosilación también dan como resultado un aumento sustancial de la producción de PreF. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los antígenos de PreF tienen un sitio de glicosilación modificado en la posición que corresponde al aminoácido 500 de la secuencia de PreF de referencia (SEQ ID NO: 2), por ejemplo, en la posición 470 del antígeno de PreF de la SEQ ID NO: 6). De forma adecuada, las modificaciones incluyen las secuencias: NGS; NGT en los aminoácidos que corresponden a las posiciones 500-502 de la secuencia de polipéptidos de la proteína F de referencia. El aminoácido de una realización a modo de ejemplo que incluye una modificación de "NGT" se proporciona en la SEQ ID NO: 18. Un experto en la materia puede determinar fácilmente algunas modificaciones similares para el NGS correspondiente. Tales modificaciones se combinan de forma favorable con cualquiera de las mutaciones de estabilización desveladas en el presente documento (por ejemplo, un bucle superenrollado heterólogo, tal como una cremallera de isoleucina, dominio y/o una modificación en una región hidrófoba, y/o retirada de pep27, y/o retirada de un sitio de escisión de furina, y/o retirada de un sitio de escisión que no es furina, y/o retirada de un sitio de escisión que no es furina). Por ejemplo, en una realización específica, el antígeno de PreF incluye una sustitución que elimina un sitio de escisión que no es furina y una modificación que aumenta la glicosilación. Una secuencia a modo de ejemplo se proporciona en la SEQ ID NO: 22 (cuya realización a modo de ejemplo incluye una modificación de "NGT" y la sustitución de glutamina en el lugar de la leucina en la posición 112).

De forma más general, una cualquiera de las modificaciones de estabilización desveladas en el presente documento, por ejemplo, adición de un dominio de estabilización heterólogo, tal como un bucle superenrollado (por ejemplo, un dominio de cremallera de isoleucina), preferentemente situado en el extremo C-terminal del antígeno de PreF soluble; modificación de un resto, tal como de leucina a lisina, en el dominio HRB hidrófobo; retirada de pep27; retirada de uno o ambos motivos de escisión de furina; retirada de un sitio de escisión que no es furina; y/o modificación de un sitio de glicosilación se puede usar en combinación con una cualquiera o más (o hasta todas en cualquier combinación deseada) de las otras modificaciones de estabilización. Por ejemplo, un bucle superenrollado heterólogo (u otro dominio de estabilización heterólogo) se puede usar solo o en combinación con cualquiera de: una modificación en una región hidrófoba, y/o retirada de pep27, y/o retirada de un sitio de escisión de furina, y/o retirada de un sitio de escisión que no es furina, y/o retirada de un sitio de escisión que no es furina. En ciertas realizaciones específicas, el antígeno de PreF incluye un dominio de bucles superenrollados C-terminal (cremallera de isoleucina), una sustitución de estabilización en el dominio hidrófobo de HRB, y retirada de uno o ambos sitios de escisión de furina. Un antígeno de este tipo incluye el péptido de fusión intacto que no se retira por escisión de furina. En una realización específica, el antígeno de PreF también incluye un sitio de glicosilación modificado en la posición 500 del aminoácido.

El polipéptido de la proteína F nativa se puede seleccionar entre cualquier proteína de F de una cepa A del VSR o B del VSR, o de variantes de las mismas (como se ha definido anteriormente). En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, el polipéptido de la proteína F es la proteína F representada por la SEQ ID NO: 2. Para facilitar la comprensión de la presente divulgación, todas las posiciones de los restos de aminoácidos, independientemente de la cepa, se proporcionan con respecto a (es decir, la posición del resto de aminoácido corresponden con) la posición del aminoácido de la proteína F a modo de ejemplo. Algunas posiciones del aminoácido comparables con cualquier otra cepa A o B del VSR las pueden determinar fácilmente los expertos habituales en la materia alineando las secuencias de aminoácidos de la cepa del VSR con la secuencia a modo de ejemplo usando algoritmos de alineamiento rápidamente disponibles y bien conocidos (tales como BLAST, por ejemplo, usando parámetros por defecto). Numerosos ejemplos adicionales de polipéptidos de la proteína F de diferentes cepas del hube de ser se desvelan en el documento WO2008114149. Algunas variantes adicionales pueden surgir a través de deriva genética, o se pueden producir de forma artificial usando mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria o mediante recombinación de dos o más variantes asistentes previamente. Tales variantes adicionales tales son adecuadas en el contexto de los antígenos de PreF desvelados en el presente documento.

En la selección de los dominios F₂ y F₁ de la proteína F, un experto en la materia reconocerá que no es estrictamente necesario incluir todo el dominio F₂ y/o F₁. Por lo general, las consideraciones conformacionales tienen importancia cuando se selecciona una subsecuencia (o fragmento) del dominio F₂. Por lo tanto, el dominio F₂ por lo general incluye una parte del dominio F₂ que facilita el ensamblaje y la estabilidad del polipéptido. En ciertas variantes a modo de ejemplo, el dominio F₂ incluye los aminoácidos 26-105. Sin embargo, también son posibles algunas variantes que tienen modificaciones menores de longitud (mediante adición, o supresión de uno o más aminoácidos).

Por lo general, el dominio F₁ se selecciona y diseño para mantener una conformación estable que incluye epítopos inmunodominantes de la proteína F. Por ejemplo, el dominio del polipéptido F1 incluye epítopo son conocidos por anticuerpos de neutralización en las regiones de los aminoácidos 262-275 (neutralización con palivizumab) y 423-436 (MAb ch101F de Centocor). Además, es deseable incluir epítopos de linfocitos T, por ejemplo, en la región de los aminoácidos 328-355. Lo más habitualmente, como una sola parte contigua de la subunidad F1 (por ejemplo, aminoácidos transmembrana 262-436). Por lo tanto, un polipéptido del dominio F₁ comprende al menos aproximadamente los aminoácidos 262-436 de un polipéptido de la proteína F del VSR. En un ejemplo limitante proporcionado en el presente documento, el dominio F₁ comprende los aminoácidos 137 a 516 de un polipéptido de la proteína F nativa.

De forma favorable, los antígenos de PreF incluyen un péptido señal que corresponde al sistema de expresión, por ejemplo, un péptido señal de mamífero o viral, tal como una secuencia señal nativa de F0 del VSR (por ejemplo, los aminoácidos 1-25 de la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 1-25 de la SEQ ID NO: 6). Por lo general, el péptido señal se selecciona para que sea compatible con las células seleccionadas para expresión recombinantes. Por ejemplo, un péptido señal (tal como un péptido señal de baculovirus, o el péptido señal de melitina, se puede sustituir para expresión, en células de insecto. En la técnica se conocen algunos péptidos señal vegetales, si se prefiere un sistema de expresión vegetal. En la técnica se conocen numerosos péptido señal a modo de ejemplo (véase, por ejemplo, Zhang y Henzel, Protein Sci., 13: 2819-2824 (2004), que describe numerosos péptidos señaló manos) y están catalogados, por ejemplo, en la base de datos de péptidos señal SPdb, que incluye secuencias señal de arqueas, procariotas y eucariotas (<http://prolina.bic.nus.edu.sg/spdb/>). Opcionalmente, cualquiera de los antígenos precedentes puede incluir una secuencia o etiqueta adicional, tal como una etiqueta de His para facilitar la purificación.

Con respecto a la selección de secuencias correspondientes a cepas de origen natural, uno o más de los dominios puede corresponder, en secuencia, con una cepa A o B del VSR, tal como los aislados de laboratorio comunes denominados A2 o Largo, o cualquier otra cepa o aislado de origen natural (como se ha desvelado en el documento WO2008114149 mencionado anteriormente). Además de tales variantes de origen natural y aisladas, algunas variantes modificadas por ingeniería que comparten similitud de secuencias con las secuencias mencionadas anteriormente también se pueden usar en el contexto de antígenos de PreF. Los expertos en la materia entenderán que la similitud entre el polipéptido del antígeno PreF (y secuencias de polinucleótidos como se describe a continuación), como para el polipéptido (y secuencias de nucleótidos en general), se puede expresar en términos de la similitud entre las secuencias, denominada de otro modo identidad de secuencias. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos de porcentaje de identidad (o similitud); cuanto más elevado es el porcentaje, más similares son las estructuras primarias de las dos secuencias. En general, cuanto más similares son las estructuras primarias de dos secuencias de aminoácidos (o polinucleótidos), más similares son las estructuras de orden superior resultantes del plegamiento y ensamblaje. Algunas variantes de secuencias de polipéptido de PreF (y polinucleótidos) tienen por lo general una o un número más pequeño de supresiones, adiciones o sustituciones de aminoácidos pero sin embargo comparten un porcentaje muy elevado de sus secuencias de aminoácidos, y por lo general sus secuencias de polinucleótidos. De forma más importante, las variantes retienen los atributos estructurales, y por lo tanto, conformacionales de las secuencias de referencia desveladas en el presente documento.

Algunos procedimientos para determinar la identidad de secuencias se conocen bien en la técnica, y son aplicables a polipéptidos del antígeno de PreF, así como los ácidos nucleicos que los codifican (por ejemplo, como se describe a continuación). Diversos programas y algoritmos de alineamiento se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Higgins y Sharp, Gene 73: 237, 1988; Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151, 1989; Corpet y col., Nucleic Acids Research 16: 10881, 1988; y Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988. Altschul y col., Nature Genet. 6: 119, 1994, presenta una consideración detallada de procedimientos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología. La Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico del NCBI (BLAST) (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403, 1990) está disponible a partir de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en internet, para uso en conexión con los programas de análisis de secuencias, blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de las secuencias usando este programa está disponible en la página web del NCBI en internet. Algunas modificaciones de la proteína F del VSR recombinante pueden incluir una supresión de uno o más aminoácidos y/o una adición de uno o más aminoácidos. De hecho, si se desea, uno o más dominios de polipéptido pueden ser un polipéptido sintético que no se corresponde con ninguna cepa individual, pero incluye subsecuencias componentes de múltiples cepas, o incluso de una secuencia consenso reducida por alineamiento de múltiples cepas de polipéptidos del virus VSR. En determinadas realizaciones, uno o más de los dominios del polipéptido se modifica mediante la adición de una secuencia de aminoácidos que constituye una etiqueta, que facilita procesamiento o purificación posteriores. Una etiqueta de este tipo puede ser una etiqueta

antigénica o de epítopo, una etiqueta enzimática o una etiqueta de polihistidina. Por lo general, la etiqueta está situada en uno o en el otro extremo de la proteína, tal como en el extremo C-terminal o N-terminal del antígeno o proteína de fusión.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN ANTÍGENOS DE PREF

5 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a ácidos nucleicos recombinantes que codifican antígenos de PreF como se ha descrito anteriormente. De forma más explícita, tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que incluyen un antígeno de polipéptido de proteína F soluble que incluye un dominio F₂ y un dominio F₁ de un polipéptido de la proteína F del VSR, que incluye al menos una modificación seleccionada entre: (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo; (ii) una adición, supresión o 10 sustitución de aminoácidos que elimina un sitio de escisión de furina en una posición que corresponde a los aminoácidos 105-109, una posición que corresponde a los aminoácidos 133-136, o en ambas posiciones que corresponden a los aminoácidos 105-109 y 133-136 del precursor de referencia de la proteína F (F₀) de la SEQ ID NO: 2; (iii) una supresión de uno o más del dominio pep27; y (iv) al menos una sustitución o adición de un 15 aminoácido hidrófilo en un dominio hidrófobo del dominio extracelular de la proteína F por sustitución de lisina por la leucina presente en la posición 512 o adición de una lisina después del aminoácido que corresponde al resto 105 de la SEQ ID NO: 2 de referencia. El polinucleótido codifica un antígeno de PreF con una modificación en un sitio de glicosilación. La naturaleza y los detalles estructurales de tales polipéptidos se han desvelado anteriormente con detalle. Un experto en la materia será capaz fácilmente de determinar secuencias de nucleótidos que codifican todas y cada una de las secuencias de polipéptidos descritas basándose en las enseñanzas del presente 20 documento, incluyendo las secuencias a modo de ejemplo proporcionadas en el listado de secuencias, y de otro modo incluidas en la presente divulgación.

Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden optimizar con codón para expresión en una célula hospedadora procariota o eucariota seleccionada. Por ejemplo, las SEQ ID NOs: 5, 12, 17, 19 y 21 son ejemplos de secuencias no limitantes, ilustrativos diferentes que codifican un antígeno de PreF, que se han optimizado con codón para expresión en células de mamífero, por ejemplo células CHO. Para facilitar la replicación y la expresión, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector, tal como un vector de expresión procariota o eucariota. Algunas células hospedadoras que incluyen ácidos nucleicos que codifican antígeno de PreF recombinante también son una característica de presente divulgación. Algunas células hospedadoras favorables incluyen células hospedadoras procariotas (es decir, bacterianas), tales como *E. coli*, así como numerosas células hospedadoras eucariotas, 30 incluyendo células de hongos (por ejemplo, levadura), células de insecto, y células de mamífero (tales como células CHO, VERO y HEK293).

Para facilitar la replicación y la expresión, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector, tal como un vector de expresión procariota o eucariota. Aunque los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento se pueden incluir en una cualquiera de una diversidad de vectores (incluyendo, por ejemplo, plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorrabia, adenovirus, virus adeno-asociados virus, retrovirus y muchos otros), lo más habitualmente, el vector será un vector de expresión adecuado para generar productos de expresión de polipéptido. En un vector de expresión, el ácido nucleico que codifica el antígeno de PreF se coloca por lo general en proximidad y orientación con una secuencia de control de transcripción apropiada (promotor, y opcionalmente, uno o más potenciadores) para dirigir la síntesis del ARNm. Es decir, la secuencia de polinucleótidos de interés se une de forma operativa a una secuencia de control de transcripción apropiada. Algunos ejemplos de tales promotores incluyen: el promotor temprano inmediato del CMV, promotor de LTR o SV40, promotor de polihedrina de baculovirus, promotor lac o trp de *E. coli*, fago T7 y promotor de P_L lambda, y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus. Por lo 40 general, director de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción, y un terminador de la transcripción. El vector opcionalmente incluye secuencias apropiadas para la amplificación de la expresión. Además, los vectores de expresión comprenden opcionalmente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para selección de células hospedadoras transformadas, tal como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a 45 kanamicina, tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector de expresión también puede incluir elementos de expresión adicionales, por ejemplo, para mejorar la eficacia de la traducción. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, un codón de inicio de ATG y secuencias adyacentes. En algunos casos, por ejemplo, un codón de inicio de la traducción y elementos de la secuencia asociados se insertan en el vector de expresión apropiado de forma simultánea con la secuencia de polinucleótidos de interés (por ejemplo, un codón de inicio nativo). En tales casos, no son necesarias señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que solamente una secuencia que codifica polipéptido, o una parte de la misma, se inserta, se proporcionan señales de control de traducción exógenas, incluyendo un codón de inicio de ATG para la traducción del ácido nucleico que codifica para el antígeno de PreF. El codón de inicio se coloca en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la secuencia de polinucleótidos de interés. 55 Los elementos de transcripción exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. Si se desea, la eficacia de la expresión se puede aumentar adicionalmente mediante la inclusión de potenciadores apropiados con respecto al sistema celular en uso (Scharf y col., (1994) Results Probl Cell Differ 20:

125-62; Bitter y col., (1987) Methods in Enzymol 153: 516-544).

En algunos casos, el ácido nucleico (tal como un vector) que codifica el antígeno de PreF incluye uno o más elementos de la secuencia adicionales seleccionados para aumentar y/o optimizar la expresión del ácido nucleico que codifica PreF cuando se introduce en una célula hospedadora. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los ácidos

5 nucleicos que codifican el antígeno de PreF incluyen una secuencia de intrón, tal como una secuencia de intrón de virus 5 del Herpes Human (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 13). De forma repetida se ha demostrado que algunos intrones aumentan la expresión de ácidos nucleicos homólogos y heterólogos cuando se colocan de forma apropiada en una construcción recombinante. Otra clase de secuencias de potenciación de la expresión incluye un elemento epigenético tal como una Región de Unión a Matriz (o MAR), o un elemento epigenético similar, por ejemplo, 10 elementos STAR (por ejemplo, tales como los elementos STAR desvelados en Otte y col., Biotechnol. Prog. 23: 801-807, 2007). Sin quedar ligado por la teoría, se cree que los MAR median en el anclaje de una secuencia de ADN diana a la matriz nuclear, generando dominios de bucle de cromatina que se extienden hacia fuera de los núcleos de la heterocromatina. Aunque las MAR no contiene ninguna secuencia consenso o reconocible evidente, parece que su característica más coherente es un contenido de A/T elevado global, y bases de C que predominan en una hebra.

15 Parece que estas regiones forman estructuras secundarias plegadas que pueden ser propensas a separación de hebras, y pueden incluir un elemento de despliegamiento de núcleo (CUE) que puede servir como el punto de nucleación para separación de hebras. Varios motivos de secuencia ricos en AT sencillos se han asociado con secuencias de MAR: por ejemplo, la caja A, la caja T, motivos de despliegamiento de ADN, sitios de unión a SATB1 (caja H, A/T/C25) y sitios de Topoisomerasa II consenso para vertebrados o Drosophila. Algunas secuencias de 20 MAR a modo de ejemplo se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20070178469 publicada, y en la solicitud de patente internacional n.º WO02/074969. Algunas secuencias de MAR adicionales que se pueden usar para aumentar la expresión de un ácido nucleico que codifica un antígeno de PreF incluyen lisozima MAR de pollo, MARp1-42, MARp1-6, MARp1-68, y MARpx-29, descritas en Girod y col., Nature Methods, 4: 747-753, 2007 (desveladas en GenBank con los N.ºs de Referencia EA423306, DI107030, DI106196, DI107561, y DI106512, 25 respectivamente). Un experto en la materia observará que la expresión se puede modular adicionalmente mediante la selección de una MAR que produce un nivel intermedio de potenciación, como se informa para MAR 1-9. Si se desea, algunas secuencias de MAR alternativas para aumento de la expresión de un antígeno de PreF se pueden identificar mediante búsqueda en bases de datos de secuencias, por ejemplo, usando software tal como MAR-Finder (disponible en la web en futuresoft.org/MarFinder), SMARTTest (disponible en la web en genomatix.de), o 30 SMARScan I (Levitsky y col., Bioinformatics 15: 582-592, 1999). En determinadas realizaciones, la MAR se introduce (por ejemplo, se transfectar) en la célula hospedadora en el mismo ácido nucleico (por ejemplo, vector) que la secuencia que codifica antígeno de PreF. En una realización alternativa, la MAR se introduce en un ácido nucleico separado (por ejemplo, en trans) y se puede cointegrar opcionalmente con la secuencia de polinucleótidos que 35 codifica antígeno de PreF.

35 Algunos procedimientos a modo de ejemplo suficientes para guiar a un experto habitual en la materia a través de la producción de ácidos nucleicos de antígeno PreF recombinante se pueden encontrar en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook y col., Molecular Cloning: Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992 (y Suplementos de 2003); y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4^a ed., Wiley & Sons, 1999.

40 Algunos ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican polipéptidos de antígeno de PreF se representan por las SEQ ID NOs: 17 y 21. La modificación en un sitio de glicosilación, en el aminoácido correspondiente a la posición 500 de la SEQ ID NO: 2 se puede producir mediante la alteración (por ejemplo, mutación) de los nucleótidos en las cercanías de las posiciones 1408-1414 (en comparación, por ejemplo, con la secuencia de polinucleótidos de la SEQ 45 ID NO: 12, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 17 y 21). Algunas secuencias de nucleótidos adecuadas para codificar variantes de glicosilación (por ejemplo, que aumentan la eficacia de la glicosilación) incluyen: aacgggt, aacaagt, aacggga, y aacaaga. También son posibles algunas secuencias alternativas, tales como cagcagt, que eliminan un sitio de glicosilación. Algunas variantes adicionales se pueden producir mediante ensamblaje de secuencias de 50 polipéptidos de proteína F análogos seleccionadas entre cualquiera de las cepas descubiertas (o posteriormente) conocidas del VSR, por ejemplo, como se desvelan el documento WO2008114149. Algunas variantes de secuencia adicionales que comparten identidad de secuencia con las variantes a modo de ejemplo las pueden producir los expertos en la materia. Los expertos en la materia entenderán inmediatamente que las secuencias de polinucleótido 55 se codifican los polipéptidos de PreF, pueden compartir por sí mismas menos identidad de secuencias debido a la redundancia del código genético.

60 Además de los ácidos nucleicos variantes descritos anteriormente, algunos ácidos nucleicos que se hibridan con uno o más de los ácidos nucleicos representados por las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y/o 21 también se pueden usar para codificar antígenos de PreF. Un experto en la materia observará que además del % de la medida de identidad de secuencias discutida anteriormente, otro indicio de similitud de secuencias entre los ácidos nucleicos es la capacidad de hibridarse. Cuanto más similares son las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más rigurosa son las condiciones en las que hibridaran. La rigurosidad de las condiciones de hibridación depende de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Por lo tanto, las condiciones de hibridación que dan como resultado grados de rigurosidad en particular variarán dependiendo de la naturaleza del procedimiento de

hibridación de elección y la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos de hibridación. por lo general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Por lo general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 °C

- 5 a 20 °C inferiores a las del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo la fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia diana se hibridan a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos y el cálculo de las rigurosidades se puede encontrar, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Para fines de la presente divulgación, "condiciones rigurosas" incluye condiciones en las que la hibridación sólo se producirá si hay una falta de coincidencias inferior a un 25 % entre la molécula de hibridación y la secuencia diana.

- 15 Las "condiciones rigurosas" pueden fracasar en niveles de rigurosidad en particular para definición más precisa. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquéllas en las que las moléculas con una falta de coincidencias de secuencias de más de un 25 % no se hibridarán; las condiciones de "rigurosidad media" son aquellas en las que las moléculas con una falta de coincidencias de más de un 15 % no se hibridarán, y las condiciones de "rigurosidad elevada" son aquellas en las que las secuencias con una falta de coincidencias de más de un 10 % no se hibridarán. Las condiciones de "rigurosidad muy elevada" son aquellas en las que las secuencias con una falta de coincidencias de más de un 6 % no se hibridarán. Por el contrario, los ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de "baja rigurosidad" incluyen aquellos con una identidad de secuencias mucho menor, o con identidad de secuencias con respecto a solamente las subsecuencias cortas del ácido nucleico. Por lo tanto, se entenderá que las diversas variantes de ácidos nucleicos que están incluidas en la presente divulgación son capaces de hibridarse con al menos una de las SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y/o 21 con respecto a sustancialmente toda su longitud.

PROCEDIMIENTOS PARA PRODUCIR POLIPÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DEL VSR

Los antígenos de PreF desvelados en el presente documento se producen usando procedimientos bien establecidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Algunos procedimientos suficientes para guiar a un experto en la materia se pueden encontrar en las siguientes referencias: Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 999. En lo sucesivo en el presente documento se proporcionan algunos detalles adicionales y específicos.

30 Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican los antígenos de PreF se introducen en células hospedadoras mediante cualquiera de una diversidad de procedimientos bien conocidos, tales como electroporación, transfección mediada por liposoma (por ejemplo, usando un reactivo de transfección liposomal disponible en el mercado, tal como LIPOFECTAMINE™2000 o TRANSFECTIN™), precipitación con fosfato cálcico, infección, transfección y similares, dependiendo de la selección de vectores y células hospedadoras. Los ácidos nucleicos que codifican antígenos de PreF se desvelan en las SEQ ID NOS: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y 21. Un experto en la materia observará que las SEQ ID NOS: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y 21 son ilustrativas y no pretenden ser limitantes. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos que codifican las mismas proteínas que las SEQ ID NOS: 5, 7 y 9, (por ejemplo, representadas por las SEQ ID NOS: 6, 8 y 10), pero que se diferencian solamente en la redundancia del código genético (tal como mediante optimización de codón alternativa, como se muestra en la SEQ ID NO: 12), se pueden usar fácilmente en lugar de las secuencias a modo de ejemplo de las SEQ ID NOS: 5, 7, y 9. Lo mismo es cierto para las SEQ ID NOS: 45 17, 19 y 21. De forma análoga, se pueden usar secuencias de polinucleótidos que incluyen elementos de potenciación de la expresión, tales como intrones colocados internamente (o mediante la adición de promotor, potenciador, intrón u otros elementos similares), como se ilustra en la SEQ ID NO: 13. Un experto habitual en la materia reconocerá que algunas combinaciones de tales modificaciones son igualmente adecuadas. De forma análoga, las secuencias homólogas seleccionadas entre cualquier cepa de A del VSR o B del VSR, y/u otras secuencias que comparten identidad de secuencias sustancial, como se ha discutido anteriormente también se pueden usar para expresar antígenos de PreF. De hecho, cualquiera de los ácidos nucleicos variantes desvelados anteriormente se pueden introducir de forma adecuada en células hospedadoras y usar para producir antígenos de PreF (incluyendo antígenos PreF-G) y cuando sea aplicable, polipéptidos G.

55 Los ácidos nucleicos que codifica antígeno recombinante de la presente invención se modifican para alterar el patrón de glicosilación como se ha descrito anteriormente mediante sustitución de uno o más aminoácidos en la proximidad de la posición 500 del aminoácido (con respecto a la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, SEQ ID NO: 17). Se ha encontrado que la modificación del patrón de glicosilación, por ejemplo, en combinación con la modificación de un sitio de reconocimiento de escisión, aumenta la producción del antígeno de PreF en cultivo celular. En tales casos, los procedimientos que se describen en lo sucesivo en el presente documento para expresión y aislamiento de antígenos de PreF recombinantes desvelan un procedimiento para aumentar la producción de un antígeno de PreF mediante la alteración del patrón de glicosilación de un antígeno de PreF mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación, opcionalmente en combinación con la modificación de

uno o más sitios de escisión (tal como un sitio de reconocimiento de escisión distinto de furina o de furina) como se ha descrito anteriormente.

Las células hospedadoras que incluyen ácidos nucleicos que codifican antígeno de PreF recombinante son, por lo tanto, también una característica de la presente divulgación. Algunas células hospedadoras favorables incluyen

5 células hospedadoras procariotas (es decir, bacterianas), tales como *E. coli*, así como numerosas células hospedadoras eucariotas, incluyendo células de hongo (por ejemplo, células de levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), células de insecto, células vegetales, y células de mamífero (tales como células CHO y HEK293). Los ácidos nucleicos de antígeno de PreF recombinantes se introducen (por ejemplo, transducidos, transformados o transfectados) en células hospedadoras, por ejemplo, a través de un vector, tal como un vector de expresión. Como se ha descrito anteriormente, de la forma más habitual el vector es un plásmido, pero tales vectores también pueden, por ejemplo, una partícula viral, un fago, etc. Algunos ejemplos de hospedador es de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como 3T3, COS, CHO, BHK, HEK 293 o melanoma de Bowes; células vegetales, incluyendo células de algas, etc. En algunos casos, se pueden usar células transfectadas de forma transitoria para producir antígenos de PreF recombinante. En determinadas realizaciones, se seleccionan células (por ejemplo, clones) que se han integrado de forma estable en el ácido nucleico de PreF y se usan para producir el antígeno PreF recombinante.

10 Las células hospedadora se pueden cultivar en medio nutriente convencional modificado si fuera apropiado para activación de promotores, selección de transformantes, o amplificación de las secuencias de polinucleótidos insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, por lo general son las usadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia y las exigencias mencionadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias citadas en ese documento. Opcionalmente, las células hospedadora se cultivan en medio sin suero y/o sin producto animal.

15 Los productos de expresión que corresponden a los ácidos nucleicos de la divulgación también se pueden producir en células animales tales como plantas, levadura, hongo, bacterias y similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, algunos detalles relacionados con el cultivo celular se pueden encontrar en Payne y col., (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

20 En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se puede seleccionar dependiendo del uso pretendido para el producto expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo para la producción de anticuerpos, de forma favorable se usan vectores que dirigen un nivel de expresión elevado de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia de codificación de interés, por ejemplo, un polinucleótido de la invención como se ha descrito anteriormente, se puede ligar en el vector en marco con secuencias para la traducción amino-terminal comenzando en Metionina y los 7 restos posteriores de beta-galactosidasa que producen una proteína de fusión de beta galactosidasa catalíticamente activa; vectores de pIN (Van Heeke y Schuster (1989) *J Biol Chem* 264: 5503-5509). En ciertos ejemplos, los ácidos nucleicos se introducen en células a través de vectores adecuados para introducción y expresión en células procariotas, por ejemplo, células de *E. coli*. Por ejemplo, un ácido nucleico que incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica un antígeno de PreF se puede introducir en cualquiera de una diversidad de vectores disponibles en el mercado o de patentados, tales como la serie pET de vectores de expresión (por ejemplo, pET9b y pET2d). La expresión de la secuencia de codificación es inducible por IPTG, dando como resultado niveles elevados de expresión de proteína. La secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno de PreF se transcribe con el promotor T7 de fago. Algunos vectores alternativos, tales como pURV22 que incluyen un promotor de pL lambda inducible por calor también son adecuados.

25 El vector de expresión se introduce a continuación (por ejemplo, mediante electroporación) en un hospedador bacteriano adecuado. Numerosas cepas adecuadas de *E. coli* están disponibles y las puede seleccionar un experto en la materia (por ejemplo, se ha demostrado que las cepas Rosetta y BL21 (DE3) son favorables para la expresión de vectores recombinantes que contienen secuencias de polinucleótidos que codifican antígenos de PreF).

30 De forma análoga, en herraduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, un número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH se pueden usar para producción de los productos de expresión deseados. Para revisiones, véase Berger, Ausubel, y, por ejemplo, Grant y col., (1987; *Methods in Enzymology* 153: 516-544). En células hospedadoras de mamífero, se puede usar un número de sistemas de expresión, incluyendo tanto plásmidos como sistemas basados en virus.

35 En otro ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno de PreF se introduce en células de insecto usando un Sistema de Vector de Expresión de Baculovirus (BEVS). Algunos baculovirus recombinantes capaces de infectar células de insectos se pueden generar usando vectores, kits y/o sistemas disponibles en el mercado, tales

como el sistema BD BaculoGold de BD BioScience. En resumen, la secuencia de polinucleótidos que codifican el antígeno se inserta en el vector de transferencia de pAcSG2. A continuación, las células hospedadoras SF9 (*Spodoptera frugiperda*) se cotransfectan mediante plásmido químérico de pAcSG2 y BD BaculoGold, que contiene el ADN genómico linealizados del baculovirus *virus de la poliedrosis nuclear de Autographa californica* (AcNPV).

5 Después de la transfección, la recombinación homóloga se produce entre el plásmido de pACSG2 y el genoma del Baculovirus para generar el virus recombinante. En un ejemplo, el antígeno de PreF is se expresaba bajo el control regulador del promotor de polihedrina (pH). Algunos vectores de transferencia similares se pueden producir usando otros promotores, tales como los promotores básicos (Ba) y p10. De forma análoga, se pueden usar células de insecto alternativas, tales como SF21 que está muy relacionada con la línea celular de Sf9, y la línea celular High 10 Five derivada de un gusano falso medidor de la col, *Trichoplusia ni*.

Más habitualmente, los polinucleótidos que codifican los antígenos de PreF se incorporan en vectores de expresión que son adecuados para introducción y expresión en células eucariotas (por ejemplo, células de insecto o mamífero). De forma favorable. Travesaños nucleicos están optimizados con codón para expresión en el vector/célula hospedadora seleccionados (por ejemplo, las secuencias ilustradas en las SEQ ID NOS: 5, 7, 9, 12, 13,

15 17, 19 y 21 están utilizadas con codón para la expresión en células CHO). En una realización a modo de ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno de PreF se introduce en un vector, tal como vector pEE14 desarrollado por Lonza Biologicals. El polipéptido se expresa bajo un promotor constitutivo, tal como el promotor de CMV temprano inmediato (CitoMegaloVirus). La selección de las células transfectados de forma estable que expresan el polipéptido se realiza basándose en la capacidad de las zonas afectadas para crecer en ausencia de una fuente de glutamina. Las células que han integrado de toma satisfactoria el pEE14 son capaces de crecer en ausencia de glutamina exógena, porque el vector pEE14 expresa la enzima GS (Glutamina Sintetasa). Las células seleccionadas se pueden expandir de forma clonal y caracterizar para expresión del polipéptido PreF deseado.

20 Una célula hospedadora se elige opcionalmente por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la forma deseada. Tales modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, (así como, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, lipidación y acilación). El procesamiento después de la traducción que, por ejemplo, escinde una forma precursora en una forma madura de la proteína (por ejemplo, mediante una furina proteasa) se realiza opcionalmente en el contexto de la célula hospedadora. Algunas células hospedadoras diferentes tales como 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38, etc. tienen maquinaria celular y mecanismos característicos específicos para actividades después de la traducción de este tipo y se pueden elegir para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña introducida.

25 Para producción con alto rendimiento, a largo plazo de antígenos de PreF recombinante desvelados en el presente documento, por lo general se usan sistemas de expresión estables. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable polipéptido de antígeno de PreF se introducen en la célula hospedadora usando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación viral o elementos de expresión endógenos y un gen marcador 30 seleccionable. Después de la introducción del vector, se permite que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se intercambie por medio selectivo. La finalidad del marcador seleccionables es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan de forma satisfactoria las secuencias introducidas. Por ejemplo, algunos grupos o colonias existentes de células 40 transformadas de forma estable se pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula. Las células hospedadoras transformadas con un ácido nucleico que codifica un antígeno de PreF se cultivan opcionalmente en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo celular. Como se ha indicado anteriormente, si se desea, las células hospedadoras se pueden cultivar en medio sin suero (y/o sin producto animal).

45 Después de la transducción de una línea de células hospedadoras adecuada y crecimiento de las células hospedadoras a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce mediante medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de temperatura o inducción térmica) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Opcionalmente, el medio incluye componentes y/o aditivos que disminuyen la declaración de proteínas 50 expresadas por proteinasas. Por ejemplo, el medio usado para cultivar las células para producir el antígeno PreF pueden incluir un inhibidor de proteasa, tal como un agente de quelación o inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, AZ11557272, AS 111793, etc.), para reducir o eliminar la escisión indeseada mediante proteinasas celulares, o extracelulares (por ejemplo, matriz).

55 El producto de polipéptido secretado se recupera a continuación del medio de cultivo. Como alternativa, las células se pueden cosechar mediante centrifugación, interrumpir mediante medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante se puede retener para purificación adicional. Las células eucariotas o microbianos usadas en expresión de proteínas se pueden interrumpir mediante cualquier procedimiento conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica, o uso de agentes de lisado celular, u otros procedimientos, que son bien conocidos por los expertos en la materia.

60 Los antígenos de PreF expresados se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante cualquiera de un número de procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, filtración, ultrafiltración, centrifugación, cromatografía de

intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas de etiquetados indicados en el presente documento), cromatografía de hidroxilapatita, y cromatografía de lectina. Se pueden usar etapas de replegamiento de proteínas, si se desea, para completar la configuración de la proteína madura. Por último, en las etapas de purificación final se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Además de las referencias indicadas anteriormente, en la técnica se conoce bien una diversidad de procedimientos de purificación, incluyendo, por ejemplo, los que se exponen en Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; y Bollag y col., (1996) Protein Methods, 2^a Edición Wiley-Liss, NY; Walquer (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.; Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3^a Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) Protein Purification: Principles High Resolution Methods and Applications, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walquer (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ.

En una realización a modo de ejemplo, las proteínas PreF se recuperan de las células de acuerdo con el siguiente esquema de purificación. Después de la introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido PreF en células CHO hospedadoras, células hospedadoras transfectadas de forma transitoria o poblaciones estables expandidas y comprenden la secuencia de polinucleótidos introducida se cultivan en medio y en condiciones adecuadas para el crecimiento en una escala aceptable para la finalidad deseada (por ejemplo, como se describe por lo general en Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias citadas en ese documento). Por lo general, las células se cultivan en medio sin suero a 37 °C y se pasan a intervalos de 2-3 días en Matraces de agitación o en biorreactores. Por lo general, los nuevos cultivos establecidos a partir de células expandidas en estas condiciones se realizan en biorreactores en medio sin suero y se incuban a 27 °C con pO₂ mantenido a 20 % de 5 a 7 días para producir el antígeno de preF.

Para recuperar el antígeno de PreF recombinante, el cultivo celular se centrifuga y el sobrenadante del cultivo celular se almacena a menos 70 °C hasta su uso posterior. Después descongelar los sobrenadantes del cultivo, los sobrenadantes se diluyen 2 x con agua MilliQ y el pH se ajusta a 6,0 con HCl. El sobrenadante diluido se carga a 75 cm/h en una resina CM Ceramic HyperD FF de 3 l empaquetada en una columna BPG 140/500, equilibrada en tampón fosfato 20 mM a pH 6,0. Después de la carga de la muestra, el tampón de equilibrio se procesa a través de la columna para regresar a la medida inicial de UV. Después de lavar con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón fosfato 25 mM a pH 7,0, la elución se realiza usando un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,0 que contiene NaCl 0,1 M.

El eluado CM Hyper D se diluye 3,3 x con tampón fosfato 20 mM, pH 7,0 para su procesamiento en una columna de a 270 ml de Hidroxiapatita de Tipo II (empaquetada en XK 50), equilibrada con tampón de PO₄ (Na) 20 mM a pH 7,0, a 50 ml/min. Después de lavar la columna con el tampón de equilibrado (~3 CV), la elución se realiza usando un tampón de PO₄ (Na) 20 mM a pH 7,0 que contiene NaCl 0,5 M.

El eluado de HA se procesa a 15 ml/min (para respetar un tiempo de contacto con la resina de 10 minutos), en una columna Capto Adhere de 150 ml (empaquetada en XK 26), equilibrada en tampón fosfato 20 mM a pH 7,0. Después de lavar con 5 CV de tampón fosfato 10 mM a pH 7,0 que contiene tampón de arginina 0,1 M, la elución se realiza usando un tampón de fosfato 10 mM a pH 7,0 que contiene arginina 0,6 M.

El eluado de Capto Adhere se concentra a continuación aproximadamente 10 x para su procesamiento en una columna de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) preparativa. La concentración se realiza usando una membrana Pellicon de polietersulfona de 50 kD. Antes de su procesamiento en la columna de SEC, el material se filtra a través de un filtro de 100 cm² PLANNOVA 20 N, usado como una etapa de eliminación viral. Esta etapa de nanofiltración se puede colocar después o antes de la concentración en membrana Pellicon.

A continuación, la SEC preparativa se realiza usando una columna Superdex S200 de 500 ml y tampón fosfato 10 mM (Na/K₂), NaCl 160 mM, pH 6,5 (que corresponde a tampón final) como fase móvil. Un volumen de PreF concentrado correspondiente a un 5 % del volumen de la columna de SEC se carga en la resina a ~2,6 ml/min. Por lo general, las fracciones de 10 ml se recogen. Las combinaciones analíticas de fracciones se pueden analizar en gel de SDS mediante tinción con plata y transferencia de Western anti HCP (proteínas de célula hospedadora) si se desea para optimizar los rendimientos a la vez que se minimizan los niveles de HCP.

Un volumen purificado se obtiene después de la filtración en filtros Millex de 0,22 µm (como alternativa se puede usar un filtro Sterivex). Si se desea, la preparación de antígeno de PreF purificado se puede almacenar a menos 70 °C antes de su uso.

Como alternativa, las proteínas PreF pueden incluir una etiqueta de polihistidina (por ejemplo, seis histidinas), que se puede usar para facilitar la purificación. Para polipéptidos de PreF etiquetados con histidina de este tipo, se puede usar el siguiente protocolo de purificación. Antes de la purificación usando cromatografía por afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), el sobrenadante del cultivo celular se diluye dos veces en tampón A (Bicina 20 mM, pH 8,5) y el pH se ajusta a 8,5. La solución resultante se carga en una columna de Q sepharose FF (GE Healthcare), por ejemplo, de 23 ml de volumen de columna, equilibrada previamente con tampón A. Las proteínas PreF se capturan en la columna, junto con algunos contaminantes de la célula hospedadora. Los componentes del medio de cultivo que interferirían con la etapa de purificación con IMAC no se retienen y se eliminan en el flujo continuo. Las

proteínas se separan y se eluyen mediante una elución en etapas con NaCl 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM y 1 M. Las proteínas PreF de interés se eluyen durante la primera etapa con NaCl 200 mM. Opcionalmente, la recuperación se puede controlar usando SDS PAGE y transferencia de Western usando un anticuerpo anti etiqueta de His para detectar la proteína PreF etiquetada. Las fracciones se pueden combinar antes de continuar con la purificación.

La proteína PreF (combinada) que contiene eluato se diluye tres veces en tampón B (Bicina 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,3) y el pH se ajusta a 8,3. La solución resultante se carga en resina de IMAC sepharose FF cargada con cloruro de níquel (GE Healthcare) (por ejemplo, de 5 ml de volumen de columna), equilibrada previamente con tampón B. Las PreF se unen a la resina y la mayoría de los contaminantes de la célula hospedadora se eluyen en el flujo continuo. La columna se lava con Imidazol 20 mM para retirar los contaminantes unidos semanalmente. Las proteínas PreF se eluyente mediante una etapa de elución de Imidazol 250 mM. Para identificar fracciones positivas se pueden realizar SDS PAGE teñido con azul de Coomassie y transferencia de Western anti etiqueta de His.

La combinación de IMAC se puede concentrar a continuación hasta una concentración de al menos 150 µg/ml usando un dispositivo de concentración centricon (Millipore) y la proteína se puede dializar en tampón PBS complementado con L-Arginina 500 mM. La proteína resultante se cuantifica usando el ensayo de proteína RCDC (BioRad) y se almacena a -70 °C o -80 °C hasta su uso.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y PROCEDIMIENTOS

También se proporcionan composiciones inmunogénicas que incluyen cualquiera de los antígenos de PreF desvelados anteriormente (tal como las proporcionadas a modo de ejemplo con la SEQ ID NOs: 18 y 22) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la divulgación, la composición inmunogénica puede incluir una proteína G aislada, recombinante y/o purificada. En la técnica se han descrito numerosas proteínas G adecuadas, e incluyen proteínas G recombinantes de longitud completa y proteínas químéricas formadas por una parte de la proteína G (tal como los aminoácidos 128-229 o 130-230) y un compañero de fusión (tal como tiorredoxina), o una secuencia señal y/o directora, que facilitan la expresión y/o purificación. Algunas proteínas G a modo de ejemplo para uso en mezcla con un antígeno de PreF se pueden encontrar en el documento WO2008114149, Patente de Estados Unidos n.º 5.149.650, Patente de Estados Unidos n.º 6.113.911, Solicitud Publicada de Estados Unidos n.º 20080300382, y Patente de Estados Unidos n.º 7.368.537. Como se indica con respecto a las proteínas PreF-G químéricas, un fragmento más pequeño de la proteína G, tal como la parte entre los aminoácidos 149-229, o la parte entre aproximadamente 128 y aproximadamente 229 se puede usar de forma favorable en el contexto de mezclas que implican un PreF (sin G) y G. Como se ha analizado anteriormente, la consideración importante es la presencia de epítopos inmunodominantes, por ejemplo, incluidos dentro de la región de los aminoácidos 183-197. Como alternativa, en tales composiciones se puede usar una proteína G de longitud completa.

Algunos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien y los pueden seleccionar los expertos en la materia. Por ejemplo, el vehículo o excipiente puede incluir de forma favorable un tampón. Opcionalmente, el vehículo o excipiente también contiene al menos un componente que estabiliza la solubilidad y/o estabilidad. Algunos ejemplos de agentes solubilizantes/estabilizantes incluyen detergentes, por ejemplo, lauril sarcosina y/o tween. Algunos agentes solubilizantes/estabilizantes adecuados incluyen arginina, y polioles que forman vidrio (tales como sacarosa, trehalosa y similares). En la técnica se conocen numerosos vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences de Remington, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5^a Edición (1975). Por consiguiente, algunos excipientes y vehículos adecuados los pueden seleccionar los expertos en la materia para producir una formulación adecuada para administrar a un sujeto mediante una vía de administración seleccionada.

Algunos excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: glicerol, Polietilenenglicol (PEG), Sorbitol, Trehalosa, San sódica de N-lauroilsarcosina, L-prolina, sulfobetaina no detergente, clorhidrato de Guanidina, Urea, óxido de Trimetilamina, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ y otras sales relacionadas con cationes divalentes, Ditiotreitol, Ditiokeritol, y β-mercaptopropanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (incluyendo: Tween 80, Tween 20, Triton X-00, NP-40, Empigen BB, Octilglucósido Lauroil maltósido, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, desoxicolato sódico, dodecil sulfato sódico, bromuro de Cetiltrimetilamonio).

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también incluyen una adyuvante. En el contexto de una composición inmunogénica adecuada para administración a un sujeto con el fin de provocar una respuesta inmune protectora frente al VSR, el adyuvante se selecciona para provocar una respuesta inmune desviada hacia Th1 o equilibrada para Th1/Th2, caracterizada por la producción de interferón-gamma (IFN-γ).

Por lo general el adyuvante se selecciona para que aumente una respuesta inmune desviada hacia Th1 (o una respuesta inmune equilibrada para Th1/Th2), caracterizada por la producción y secreción de IFN-γ, en el sujeto, o población de sujetos, a los que se administra la composición. Por ejemplo, cuando la composición inmunogénica se va a administrar a un sujeto de un grupo de edades en particular susceptible a (o con un aumento del riesgo de) infección por VSR, el adyuvante se selecciona para que sea seguro y eficaz en el sujeto o población de sujetos. Por

lo tanto, cuando se formula una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF del VSR para administración en un sujeto de mayor edad (tal como un sujeto con una edad superior a 65 años de edad), el adyuvante se selecciona para que sea seguro y eficaz en sujetos de edades avanzadas. De forma análoga, cuando la composición inmunogénica que contiene el antígeno de PreF del VSR se pretende para administración en sujetos

5 neonatales o infantiles (tales como sujetos entre el nacimiento y la edad de dos años), el adyuvante selecciona para que sea seguro y eficaz en neonatos y niños. En el caso de un adyuvante seleccionado para seguridad y eficacia en neonatos y niños, se puede seleccionar una dosis de adyuvante que es una dilución (por ejemplo, una dosis fraccionaria) de una dosis administrada por lo general a un sujeto adulto.

Además, el adyuvante por lo general se selecciona para que aumente una respuesta inmune de Th1 cuando se 10 administra a través de la vía de administración, mediante la que se administra la composición inmunogénica. Por ejemplo, cuando se formula una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF para administración nasal, son favorables proteosoma y protolina son adyuvantes de desviación de Th1 favorables. Por el contrario, cuando la composición inmunogénica se formula para administración intramuscular, se seleccionan de forma favorable algunos adyuvantes que incluyen uno o más de 3D-MPL, escualeno (por ejemplo, QS21), liposomas, y/o 15 emulsiones de aceite y agua.

Una adyuvante adecuado para uso en combinación con antígenos de PreF es un derivado de lipopolisacárido bacteriano no tóxico. Un ejemplo de un derivado no tóxico adecuado de lípido A, es el monofosforil lípido A o más particularmente el monofosforil lípido A 3-Desacilado (3D-MPL). El 3D-MPL se comercializa con el nombre MPL en GlaxoSmithKline Biologicals N.A., y a través del documento se denomina MPL o 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las 20 Patentes de Estados Unidos n.^os 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. El 3D-MPL estimula principalmente las respuestas de los linfocitos CD4⁺ T con un fenotipo de IFN-γ (Th1). El 3D-MPL se prevé producir de acuerdo con los procedimientos que se desvelan en el documento GB2220211 A. Químicamente se trata de una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención, 25 se puede usar 3D-MPL de partícula pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula de modo que se puede filtrar de forma estéril a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en el documento WO94/21292.

Un lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, se puede usar en cantidades entre 1 y 50 µg, por dosis humana de la 30 composición inmunogénica. Tal 3D-MPL se puede usar a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20-30 µg, de forma adecuada entre 21-29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg. En una realización más, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo entre 1 y 9 µg, o entre 2 y 8 µg o de forma adecuada entre 3 y 7 µg o 4 y 6 µg, o 5 µg.

35 En otras realizaciones, el lipopolisacárido puede ser un disacárido β(1-6) glucosamina, como se describe en la Patente de Estados Unidos n.^o 6.005.099 y en el documento de Patente EP n.^o 0 729 473 B1. Un experto en la materia sería rápidamente capaz de producir diversos lipopolisacáridos, tal como 3D-MPL, basándose en las enseñanzas de estas referencias. Además agentes inmunoestimulantes mencionados anteriormente (que tienen una estructura similar a la de LPS o MPL o 3D-MPL), monosacárido acilado y derivados de disacárido que son una subparte de la estructura de MPL mencionada anteriormente también son adyuvantes adecuados. En otras 40 realizaciones, el adyuvante es un derivado sintético del lípido A, algunos de los cuales se describen como agonistas de TLR-4, e incluyen, pero no se limitan a: OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenfosfato), (documento WO 95/14026); OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documento WO 99/64301 y documento WO 00/0462); y OM 197 MP-Ac DP (3S;- 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127).

Otros ligandos de TLR4 que se pueden usar son fosfatos de alquil Glucosamínido (AGP) tales como los desvelados 50 en el documento WO 98/50399 o en la Patente de Estados Unidos n.^o 6.303.347 (también se desvelan algunos procedimientos para la preparación de los AGP), de forma adecuada RC527 o RC529 o sales farmacéuticamente aceptables de los AGP como se desvela en Patente de Estados Unidos n.^o 6.764.840. Algunos AGP son agonistas de TLR4 y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de causar una respuesta de señalización a través de TLR-4 (Sabroe y 55 col., JI 2003 p1630-5) son, por ejemplo, lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; Proteína A de tensioactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2, y dipéptido muramilo (MDP). En una realización, el agonista de TLR es HSP 60, 70 o 90. Otros ligandos de TLR-4 adecuados son los que se describen en el documento WO 2003/011223 y en el documento WO 2003/099195, tales 60 como el compuesto I, compuesto II y compuesto III desvelados en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223

o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195 y en particular los compuestos desvelados en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, y ER804764. Por ejemplo, un ligando de TLR-4 adecuado es ER804057.

5 Algunos agonistas de TLR adicionales también son útiles como adyuvantes. La expresión "agonista de TLR" se refiere a un agente es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR,

ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de generación de ligando endógeno o exógeno. Tales agonistas de TLR naturales o sintéticos se pueden usar como adyuvantes alternativos o adicionales. Una breve revisión del papel de los TLR como receptores de adyuvante se proporcionan en Kaisho y Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589: 1-13, 2002. Estos adyuvantes potenciales incluyen, pero no se limitan a, agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. Por consiguiente, en una realización, el adyuvante y la composición inmunogénica comprenden adicionalmente un adyuvante que se selecciona entre el grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, un agonista de TLR-9, o una combinación de los mismos.

15 En una realización de la presente invención, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-1. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-1 se selecciona entre: lipopéptidos tri-acilados (LP); modulina soluble en fenol; LP de *Mycobacterium tuberculosis*; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, triclorhidrato (Pam3Cys) LP que imita el extremo amino terminal acetilado de una lipoproteína bacteriana y OspA LP de *Borrelia burgdorferi*.

20 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2 es uno o más de uno de una lipoproteína, un peptidoglicano, un lipopéptido bacteriano de *M tuberculosis*, *B burgdorferi* o *T pallidum*; peptidoglicanos de especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de *Neisseria*, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de *Yersina*, viriones del CMV, hemaglutinina de sarampión, y zimosano de levadura.

25 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-3. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-3 es ARN bicatenario (ARNds), o ácido poliinosínico-policitidílico (Poly IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado con infección viral.

30 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5 es flagelina bacteriana.

35 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-6. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-6 es lipoproteína micobacteriana, LP di-acilado, y modulina soluble en fenol. Algunos agonistas de TLR6 adicionales se describen en el documento WO 2003/043572.

40 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7 es un ARN monocatenario (ARNss), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o derivado del mismo. En una realización, el agonista de TLR es imiquimod. Algunos agonistas de TLR7 adicionales se describen en el documento WO 2002/085905.

45 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-8. De forma adecuada, el agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-8 es un ARN monocatenario (ARNss), una molécula de imidazoquinolina con actividad anti-viral, por ejemplo resiquimod (R848); el resiquimod también es capaz de reconocimiento mediante TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que se pueden usar incluyen los que se describen en el documento WO 2004/071459.

50 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9. En una realización, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es HSP90. Como alternativa, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es ADN bacteriano o viral, ADN que contiene nucleótidos de CpG sin metilar, en contextos de secuencias en particular conocidos como motivos de CpG. Algunos oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta de Th1 predominantemente. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/02555, el documento WO 99/33488 y Patentes de Estados Unidos n.^os 6.008.200 y 5.856.462. De forma adecuada, los nucleótidos de CpG son oligonucleótidos de CpG. Algunos oligonucleótidos adecuados para uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, opcionalmente que contienen dos o más motivos de CpG dinucleótidos separados por al menos tres, adecuadamente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo de CpG es un nucleótido de Citosina seguido de un nucleótido de Guanina. Los

oligonucleótidos de CpG de la presente invención son por lo general desoxinucleótidos. En una realización específica, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o adecuadamente un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleótido están dentro del alcance de la invención. Dentro del alcance de la invención también están incluidos oligonucleótidos con uniones internucleótido mixtas. Algunos procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en las Patentes de Estados Unidos n.ºs 5.666.153, 5.278.302 y en el documento WO 95/26204.

Otros adyuvantes que se pueden usar en composiciones inmunogénicas con un antígeno PreF, por ejemplo, por sí mismos o en combinación con 3D-MPL, u otro adyuvante descrito en el presente documento, son las saponinas, tales como QS21.

Algunas saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Las saponinas son glicósidos de esteroide o triterpeno ampliamente distribuidos en los reinos vegetales y animal marino. Las saponinas destacan por formar soluciones coloidales en agua que forman espuma cuando se agitan, y porque precipitan el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares, crean estructuras similares a poros en la membrana que hacen que la membrana estalle. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas, pero no de todas, las saponinas.

Las saponinas se conocen como adyuvantes en vacunas para administración sistémica. La actividad de adyuvante y hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado extensamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, mencionado anteriormente). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol de América del Sur, Quillaja Saponaria Molina), y fracciones del mismo, se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55; y documento de patente EP 0 362 279 B1. Algunas estructuras con partículas, denominadas Complejos de Estimulación Inmune (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., documento EP 0 109 942 B1; documento WO 96/11711; documento WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el procedimiento para su producción se desvela en la Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las obtenidas a partir de otras especies vegetales tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford y col., *Vaccina*, 10 (9): 572-577, 1992).

QS21 es una fracción no tóxica purificada de Hplc derivado de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Un procedimiento para producir QS21 se desvela en Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540. Algunas formulaciones de adyuvante no reactogénicas que contienen QS21 se describen en el documento WO 96/33739. Dicha saponina inmunológicamente activa, tal como QS21, se puede usar en cantidades entre 1 y 50 µg, por dosis humana de la composición inmunogénica. De forma ventajosa, QS21 se usa a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20-30 µg, adecuadamente entre 21-29 µg o entre 22-28 µg o entre 23-27 µg o entre 24 -26 µg, o 25 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6 -14 µg, por ejemplo entre 7 -13 µg o entre 8 -12 µg o entre 9 -11 µg, o 10 µg. En una realización más, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo entre 1-9 µg, o entre 2 -8 µg o adecuadamente entre 3-7 µg o 4-6 µg, o 5 µg. Se ha mostrado que tales formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son adyuvantes de estimulación de Th1 satisfactorios fondos se formulan en conjunto con un agente. Por lo tanto, por ejemplo, algunos polipéptidos de PreF se pueden usar de forma favorable en composiciones inmunogénicas con un adyuvante que comprende una combinación de QS21 y colesterol.

Opcionalmente, el adyuvante también puede incluir sales minerales tales como sales de aluminio o calcio, en particular hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato cálcico. Por ejemplo, un adyuvante que contiene 3D-MPL en combinación con una sal de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio o "alum") es adecuado para formulación en una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF para administración a un sujeto humano.

Otra clase de adyuvantes de desviación de Th1 adecuados para uso en formulaciones con antígenos de PreF incluye composiciones inmunoestimulantes a base de OMP. Las composiciones inmunoestimulantes a base de OMP son particularmente adecuadas como adyuvantes mucosales, por ejemplo, para administración intranasal. Las composiciones inmunoestimulantes a base de OMP son un género de preparaciones de proteínas de membrana externa (OMP, que incluyen algunas porinas) de bacterias Gram-negativas, tales como, pero no limitadas a, especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo, Lowell y col., *J. Exp. Med.* 167: 658, 1988; Lowell y col., *Science* 240: 800, 1988; Lynch y col., *Biophys. J.* 45: 104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines" 2^a ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basilea, Hong Kong, página 193, 1997; Patente de Estados Unidos n.º 5.726.292; Patente de Estados Unidos n.º 4.707.543), que son útiles como un vehículo o en composiciones para inmunógeno, tales como antígenos bacterianos o virales. Algunas composiciones inmunoestimuladoras a base de OMP se pueden denominar "Proteosomas", que son hidrófobos y seguros para uso humano. Los proteosomas tienen la capacidad para autoensamblarse en vesículas o grupos de OMP similares a las vesículas de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, y para incorporar, coordinar, asociar (por ejemplo, preforma electrostática o hidrófoba), o

- de otro modo cooperar de forma no covalente con antígenos de proteína (Ags), en particular antígenos que tienen un resto hidrófobo. Cualquier procedimiento de preparación que dé como resultado el componente de la proteína de la membrana externa en forma vesicular o similar a vesícula, incluyendo estructuras membranosas las multi-moleculares o composiciones de OMP similares a glóbulos fundidos de una o más OMP, está incluido dentro de la definición de 5 Proteosoma. Los proteosomas se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.726.292 o Patente de Estados Unidos n.º 5.985.284). Los proteosomas también pueden contener un lipopolisacárido o lipoooligosacárido endógeno (LPS o LOS, respectivamente) que se originan a partir de las bacterias usadas para producir las porinas de OMP (por ejemplo, especies de *Neisseria*), que por lo general serán menos de un 2 % de la preparación de la OMP total.
- 10 Los proteosomas están formados principalmente por proteínas de la membrana externa a extraídas de forma química (las OMP) de *Neisseria meningitidis* (principalmente las porinas A y B así como OMP de clase 4), mantenidas en solución con detergente (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Los proteosomas se pueden formular con una diversidad de antígenos tales como proteínas purificadas o 15 recombinantes derivadas de fuentes virales, incluyendo los polipéptidos de PreF desvelados en el presente documento, por ejemplo, mediante procedimientos tradicionales de diafiltración o de diálisis. La retirada gradual del detergente permite la formación de complejos hidrófobos de partículas de aproximadamente 100-200 nm de diámetro (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).
- 20 "Proteosoma: LPS o Protolina", como se usa en el presente documento, se refiere a preparaciones de proteosomas mezcladas, por ejemplo, mediante la adición exógena, con al menos un tipo de lipo-polisacárido para proporcionar una composición de OMP-LPS (que puede funcionar como una composición inmunoestimulante). Por lo tanto, la composición de OMP-LPS puede estar formada por dos de los componentes básicos de la Protolina, que incluyen (1) una preparación de proteína de membrana externa de Proteosomas (por ejemplo, Projuvant) preparada a partir 25 de bacterias Gram-negativas, tales como *Neisseria meningitidis*, y (2) una preparación de uno o más liposacáridos. Un lipo-oligosacárido puede ser endógeno (por ejemplo, contenido de forma natural con la preparación de Proteosoma de OMP), se puede mezclar o combinar con una preparación de OMP a partir de un lipo-oligosacárido preparado de forma exógena (por ejemplo, preparado a partir de un cultivo o microorganismo diferente de a la 30 preparación de OMP), o puede ser una combinación de los mismos. Tales LPS añadidos de forma exógena pueden ser de la misma bacteria Gram-negativa a partir de la que se fabricó la preparación de OMP o de una bacteria Gram-negativa diferente. Se debería entender que la protolina incluye opcionalmente lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, moléculas pequeñas, o similares, y combinaciones de los mismos. La Protolina se puede preparar, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0044425.
- 35 Las combinaciones de diferentes adyuvantes, tales como las mencionadas anteriormente en el presente documento, también se pueden usar en composiciones con antígenos de PreF. Por ejemplo, como ya se ha indicado, QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La proporción de QS21 : 3D-MPL por lo general será del orden de 1:10 a 10:1; tal como de 1:5 a 5:1, y a menudo sustancialmente 1:1. Por lo general, la proporción está en el intervalo de 2,5:1 a 1:1 de 40 3D-MPL: QS21. Otra formulación de adyuvante de combinación incluye 3D-MPL y una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. Cuando se formula en combinación con esta combinación puede aumentar una respuesta inmune de Th1 específica de antígeno.
- 45 En algunos casos, la formulación de adyuvante es una sal mineral, tal como una sal de calcio o aluminio (alum), por ejemplo fosfato cálcico, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. Cuando el alum está presente, por ejemplo, en combinación con 3D-MPL, la cantidad está por lo general entre aproximadamente 100 µg y 1 mg, tal como aproximadamente 100 µg, o de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 750 µg, tal como aproximadamente 500 µg por dosis.
- En algunas realizaciones, el adyuvante incluye una emulsión de aceite y agua, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua. Un ejemplo de una emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, un tocol tal como tocoferol, por ejemplo, alfa-tocoferol, y un tensioactivo, tal como trioleato de sorbitán (Span 85™) o 50 monooleato de polioxietileno y sorbitán (Tween 80™), en un vehículo acuoso. En determinadas realizaciones, la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante(s) adicional, (en particular, no contiene un derivado del lípido A no tóxico, tal como 3D-MPL, o una saponina, tal como QS21). El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina campanada con fosfato. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.
- 55 En otra realización de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua y opcionalmente uno o más agentes inmunoestimulantes, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende 0,5-10 mg de aceite metabolizable (adecuadamente escualeno), 0,5-11 mg de tocol (adecuadamente un tocoferol, tal como alfa-tocoferol) y 0,4-4 mg de agente emulgente.
- 60 En una realización específica, la formulación de adyuvante incluye 3D-MPL preparado en forma de una inclusión, tal como en forma de una emulsión de aceite en agua. En algunos casos, la emulsión tiene un tamaño de partícula

pequeña inferior a 0,2 µm de diámetro, como se desvela en el documento WO 94/21292. Por ejemplo, las partículas de 3D-MPL pueden ser lo suficientemente pequeñas como para filtrarse de forma estéril a través de una membrana de 0,2 µm (como se describe en el número de Patente Europea 0 689 454). Como alternativa, el 3D-MPL se puede preparar en una formulación liposomal. Opcionalmente, el adyuvante que contiene 3D-MPL (o un derivado del mismo) también incluye un componente inmunoestimulante adicional.

El adyuvante se selecciona para que sea seguro y eficaz en la población a la que se administra la composición inmunogénica. Para poblaciones de adultos y ancianos, las formulaciones incluyen por lo general más de un componente adyuvante que por lo general se encuentra en una formulación infantil. En formulaciones en particular que usan una emulsión de aceite en agua, una emulsión de este tipo puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, tal como colesterol, escualeno, alfa tocopherol, y/o un detergente, tal como Tween 80 o Span 85. En formulaciones a modo de ejemplo, tales componentes pueden estar presentes en las siguientes cantidades: de aproximadamente 1-50 mg de colesterol, de un 2 a un 10 % de escualeno, de un 2 a un 10 % de alfa tocopherol y de un 0,3 a un 3 % de Tween 80. Por lo general, la proporción de escualeno: alfa tocopherol es igual o inferior a 1 ya que ésta proporciona una emulsión más estable. En algunos casos, la formulación también puede contener un estabilizante.

Cuando una composición inmunogénica con un antígeno de polipéptido PreF se formula para administración a un niño, la dosificación de adyuvantes determina para que sea eficaz y relativamente no reactogénica en un sujeto infantil. Por lo general, la dosificación de adyuvante en una formulación infantil es inferior (por ejemplo, la dosis puede ser una fracción de la dosis proporcionada en una formulación a administrar a adultos) que la usada en formulaciones diseñadas para administración a adultos (por ejemplo, adultos con una edad de 65 años superior). Por ejemplo, la cantidad de 3D-MPL está por lo general en el intervalo de 1 µg-200 µg, tal como 10-100 µg, o 10 µg-50 µg por dosis. Una dosis infantil está por lo general en el extremo inferior de este intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, tal como de aproximadamente 2 µg, o aproximadamente 5 µg, o aproximadamente 10 µg, a aproximadamente 25 µg, o a aproximadamente 50 µg. Por lo general, cuando se usa QS21 en la formulación, los intervalos son comparables (y están de acuerdo con las proporciones indicadas anteriormente). En el caso de una emulsión de aceite y agua (por ejemplo, una emulsión de aceite en agua), la dosis de adyuvante proporcionada a un niño o un bebé puede ser una fracción de la dosis administrada a un sujeto adulto. Una demostración de la eficacia de composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno de PreF en combinación con diversas dosis de un adyuvante de aceite en agua a modo de ejemplo se proporciona en el Ejemplo 9.

Una composición inmunogénica por lo general contiene una cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccionaria de la misma) del antígeno y se puede preparar mediante técnicas convencionales. La preparación en composiciones inmunogénicas, incluyendo aquellas para administración o sujetos humanos, por lo general se describe en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccina Design-the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, de Patente de Estados Unidos n.º 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se desvela, por ejemplo, en Likhite, Patente de Estados Unidos n.º 4.372,945 y en Armor y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.474.757.

Por lo general, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en el sujeto habitual. Inmunoprotector en este contexto no significa necesariamente que proteja completamente frente a la infección; significa protección frente a síntomas o enfermedad, en especial enfermedad grave asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se use. Por lo general, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1000 µg de proteína, tal como de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg, o aproximadamente 50 µg. La cantidad usada en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población de sujetos (por ejemplo, infantil o adulta). Una cantidad continua para una composición en particular se puede discernir con estudios convencionales que implican observación de titulaciones de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas.

Se debería indicar que independientemente del adyuvante seleccionado, la concentración en la formulación final se calcula para que sea segura y eficaz en la población diana. Por ejemplo, algunas composiciones inmunogénicas para provocar una respuesta inmune frente al VSR en seres humanos se administra de forma favorable a bebés (por ejemplo, bebés entre el nacimiento y 1 años de edad, tal como entre 0 y 6 meses, a la edad de la dosis inicial). Algunas composiciones inmunogénicas para provocar una respuesta inmune frente al VSR también se administran de forma favorable a seres humanos adultos (por ejemplo, sola buena combinación con antígenos de otros patógenos asociados con EPOC). Se observará que la elección del adyuvante puede ser diferente en estas diferentes aplicaciones, y los expertos en la materia pueden determinar de forma empírica el adyuvante y concentración óptimos para cada situación.

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénica son vacunas que reducen o previenen la infección con VSR. En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénica son vacunas que reducen o previenen una respuesta patológica después de infección con VSR. Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno de PreF se formulan con al menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto

5 del VSR. Por ejemplo, el organismo patógeno puede ser un agente patógeno del tracto respiratorio (tal como un virus o bacteria que causa una infección respiratoria). En ciertos casos, la composición inmunogénica contiene un antígeno derivado del virus patógeno distinto del VSR, tal como un virus que causa una infección del tracto respiratorio, tal como gripe o parainfluenza. En otras realizaciones, los antígenos adicionales se seleccionan para facilitar la administración o reducir el número de inoculaciones necesarias para proteger a un sujeto frente a una 10 pluralidad de organismos infecciosos. Por ejemplo, el antígeno se puede derivar de uno cualquiera o más de gripe, hepatitis B, difteria, tétanos, pertussis, *Hemophilus influenza*, poliovirus, *Streptococcus* o *Pneumococcus*, entre otros.

Por consiguiente, el uso de antígenos de PreF o ácidos nucleicos que los codifican en la preparación de un medicamento para tratar (ya sea de forma terapéutica después de o de forma profiláctica antes de) la exposición a una infección con el VSR también es una característica de la presente divulgación. De forma análoga, algunos

15 procedimientos para provocar una respuesta inmune frente al VSR en un sujeto son una característica de la presente divulgación. Tales procedimientos incluyen la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende un antígeno de PreF a un sujeto, tal como un sujeto humano. Normalmente, la composición incluye un adyuvante que provoca una respuesta inmune desviada hacia Th1. La composición se formula para provocar una respuesta inmune específica para el VSR sin aumentar la enfermedad viral después del 20 contacto con el VSR. Es decir, la composición se formula para ir a como resultado una respuesta inmune desviada hacia Th1 que reduce o previene la infección con un VSR y/o reduce o previene una respuesta patológica después de infección con un VSR. Aunque la composición se puede administrar mediante una diversidad de vías diferentes, lo más habitualmente, las composiciones inmunogénica se administran mediante una vía de administración intramuscular o intranasal.

25 Por lo general, una composición inmunogénica contiene una cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccionaria de la misma) del antígeno y se puede preparar mediante técnicas convencionales.

La preparación de composiciones inmunogénicas, incluyendo las usadas para administración a sujetos humanos, por lo general se describe en *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 61 *Vaccina Design-the subunit and adjuvant approach*, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, Patente de Estados Unidos n.º 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se desvela, por ejemplo, en Likhite, Patente de Estados Unidos n.º 4.372.945 y en Armor y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.474.757.

30 Por lo general, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en el sujeto habitual. En este contexto, inmunoprotector no significa necesariamente protección completamente frente a la infección; significa protección frente a síntomas o enfermedad, especialmente enfermedad grave asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se esté usando. Por lo general, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1000 µg de proteína, tal como de aproximadamente 1 µg a 35 aproximadamente 100 µg, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg, o aproximadamente 50 µg. La cantidad usado en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población de sujetos (por ejemplo, niños o ancianos). Una cantidad óptima para una composición en particular se 40 puede discernir con estudios convencionales que implican la observación de titulaciones de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4-12 semanas. Por ejemplo, cuando se administra una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF a un sujeto infantil, las inoculaciones iniciales y posteriores se pueden administrar para que coincidan con otras vacunas administradas durante este periodo.

45 50 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones en particular.

Ejemplos

Ejemplo 1: Antígenos de PreF a modo de ejemplo

El antígeno de PreF se modificó en comparación con una proteína F del VSR nativa para estabilizar la proteína en su conformación de prefusión, basándose en la predicción de que una respuesta inmune generada en la conformación de prefusión de F incluiría preferentemente anticuerpos que evitarían la unión, conformación, desplazamiento y/o otros sucesos response.

55 La FIG. 1A y B ilustran de forma esquemática características de F0 del VSR y antígenos recombinantes de PreF a modo de ejemplo. La FIG. 1A es una representación de la proteína F0 del VSR. F0 es una proteína previa que

consiste en 574 aminoácidos. La proteína previa F0 se procesa de forma proteolítica y se glicosilada después de la traducción. Un péptido señal, que posteriormente se retira con una peptidasa señal, dirige la traducción de la proteína previa F0 al retículo endoplasmático (RE). El péptido emergente en el RE se N-glicosila a continuación en múltiples sitios (representados por triángulos). La escisión de la furina de F0 genera dominios peptídicos F2 y F1, que se pliegan y ensamblan en conjunto como un trímero de heterodímeros F2-F1 (es decir, 3 veces F2-F1). En su estado nativo, la proteína F está anclada a la membrana mediante una hélice transmembrana helix en la región C-terminal. La adición de características del polipéptido F0 incluye, 15 restos de cisteína, 4 epítopenos de neutralización caracterizados, 2 regiones de bucles superenrollados, y un motivo de lipidación. La FIG. 1B ilustra características de antígenos de PreF a modo de ejemplo. Para construir el antígeno de PreF, el polipéptido F0 se modificó para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F, reteniendo de este modo los epítopenos inmunogénicos predominantes de la proteína F como se presenta con el virus del VSR antes de la unión a y fusión con células hospedadoras. Las siguientes mutaciones de estabilización se introdujeron en el antígeno de PreF con respecto al polipéptido F0. En primer lugar, un dominio bucles superenrollados de estabilización se puso en el extremo C-terminal del dominio extracelular del polipéptido de F0, reemplazando el dominio de anclaje a membrana de F0. En segundo lugar, el péptido pep27 (situado entre los dominios F2 y F1 en la proteína nativa) se retiró. En tercer lugar, ambos motivos de furina se eliminaron. En realizaciones alternativas (denominados PreF_V1 y PreF_V2), una parte inmunológicamente activa (por ejemplo, aminoácidos 149-229) de la proteína G del VSR se añadió al dominio C-terminal.

En otras realizaciones, se introdujeron modificaciones para alterar (aumentar o disminuir) la glicosilación y/o para reducir la escisión con una proteasa distinta de la furina.

Ejemplo 2: Producción y purificación de proteína recombinante de PreF a partir de células CHO

Una secuencia de polinucleótidos recombinantes que codifica un antígeno de PreF a modo de ejemplo se introdujo células CHO hospedadoras para la producción de antígeno de PreF. Las células hospedadoras transfectadas de forma transitoria o poblaciones estables expandidas que comprenden la secuencia de polinucleótidos introducida se cultivaron en medio y en condiciones adecuadas para el crecimiento en una escala aceptable para el fin deseado (por ejemplo, como se describe por lo general en Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias citadas en ese documento). Por lo general, las células se cultivaron en medio sin suero en matraces de agitación a 37 °C con CO₂ al 5 % y se pasaron a intervalos de 2-3 días, o en biorreactores a 29 °C con pO₂ han tenido a un 20 %.

Para recuperar antígeno de PreF recombinante, el cultivo celular se centrifugó y el sobrenadante cultivo celular se almacenó a -80 °C aproximadamente hasta su uso posterior. Para un análisis más detallado, se diluyeron alícuotas de 2 litros de sobrenadante de cultivo celular con agua purificada 2x y el pH se ajustó a pH 9,5 con NaOH. El sobrenadante se cargó a una tasa de 14 ml/min en una columna de intercambio iónicos Q Sepharose FF (60 ml, 11,3 cm), equilibrada en piperazina 20 mM a pH 9,5. Después de lavar la columna con el tampón de partida, la elución se realizó con un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M de NaCl en 20 volúmenes de columna (tamaño de la fracción 10 ml). Las fracciones se analizaron en gel de SDS PAGE mediante tinción con plata y transferencia de Western. Las fracciones que contenían la proteína PreF sustancial se combinaron a continuación antes del procesamiento adicional.

La elución combinada de la etapa Q (~ 130 ml) se sometió a intercambio de tampón en fosfato 10 mM, pH 7,0 usando el sistema TFF a escala experimental de Millipore con el Pelllicon XL PSE Biomax 100 (corte de peso molecular 10.000 Da) casete de membrana . El material de Resultante tenía un pH de 7,0 y una conductividad de 1,8 mS/cm. Se cargaron 100 ml de esta muestra a 5 ml/min en 10 ml de un gel (XK 16, altura = 5 cm) de Hidroxiapatita de Tipo II (HA TII) equilibrada con tampón de PO₄ (Na) 10 mM a pH 7,0. Después de lavar la columna con el tampón de partida, la elución se realizó con un gradiente de PO₄ (Na) de 10 mM a 200 mM a pH 7,0 en 20 volúmenes de columna. Las fracciones se analizaron de nuevo en SDS PAGE con tinción de plata y azul de Coomassie y las fracciones positivas se combinaron.

Después de cromatografía de afinidad, las fracciones combinadas se concentraron y el tampón se intercambió en DPBS (pH ~ 7,4) usando una unidad concentradora Vivaspin 20, MWCO 10.000 Da. El producto final era de aproximadamente 13 ml. La concentración de la proteína fue de 195 µg/ml, evaluada con el ensayo de Lowry. La pureza era superior a un 95 %. Esta preparación de antígeno de PreF purificado se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C antes de su uso.

Ejemplo 3: Caracterización de la proteína recombinante PreF producida en células CHO

La proteína recombinante PreF producida en células CHO se caracterizó mediante fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AFF-MALS) y se comparó con un antígeno químérico que incluía componentes de las proteínas F y G del VRS. AFF-MALS permite la separación de especies de proteínas de acuerdo con su tamaño molecular en un flujo de líquido con interacción de matriz mínima y análisis adicional mediante dispersión de luz multiángulo para la determinación exacta del peso molecular. La FIG. 2A muestra que más de un 65 % del material de FG purificado se encuentra en forma de oligómeros de alto peso molecular (1000-100000 KDa) en su tampón final de PBS, mientras que un 3 % permanece en forma monomérica.

La FIG. 2B muestra que la proteína PreF purificada se pliega en su forma trimérica hasta una proporción de un 73 % en tampón PBS. Un 10 % del material se encuentra como oligómeros de 1000 a 20 000 kDa. Estos resultados indican que la proteína PreF recombinante expresada en células CHO se pliega como un trímero como se predijo para el estado nativo.

- 5 La proteína PreF purificada también se reticuló con glutaraldehído con la doble finalidad de confirmar la naturaleza soluble de la proteína en solución de tampón fosfato y para generar agregados para evaluación comparativa *in vivo* con proteína FG (véase el Ejemplo 7 que sigue a continuación). La reticulación con glutaraldehído se conoce porque proporciona una buena evaluación de la Estructura cuaternaria de una proteína, y se describe en (Biochemistry, 36: 10230-10239 (1997); Eur. J. Biochem., 271: 4284-4292 (2004)).
- 10 La proteína se incubó con un 1 %, 2 % y 5 % de agente de reticulación con glutaraldehído durante 4 horas a 4 °C y la reacción se bloqueó mediante la adición de NaBH₄. El exceso de glutaraldehído se retiro por desalación de la columna en tampón PBS. La proteína resultante se cuantificó por absorbancia a 280 nm y se evaluó por SDS PAGE en condiciones de desnaturación y reducción. Se determinó que la mayor parte del PreF recombinante purificado se determinó migraba como un trímero en solución de PBS. El aumento de la temperatura de incubación a 23 °C era necesario para convertir la mayor parte de la proteína trimérica en agregados de alto peso molecular, tal como se confirma por SDS PAGE.
- 15

Ejemplo 4: Neutralización *in vitro* con el antígeno de PreF

Los sueros humanos obtenidos de voluntarios se identificaron sistemáticamente para reactividad contra el VSR A con ELISA y se usó en el ensayo de inhibición de neutralización (NI) a dilución relevante basándose en la valoración del potencial de neutralización del VSR previa establecido para cada muestra de suero. En resumen, los sueros se mezclaron con proteínas inhibidoras (PreF o una proteína de control correspondiente esencialmente al FG químérico desvelado en la Patente de Estados Unidos n.º 5.194,595, denominado RixFG) a concentraciones de 25 µg/ml en DMEM con medio 199-H al 50 %, con FBS al 0,5 %, glutamina 2 mM, 50 µg/ml de genamicina (todos de Invitrogen), y se incubó de 1,5 a 2 horas a 37 °C en una rueda giratoria. Se mezclaron 20 µl de las diluciones en serie de proteínas de suero y proteína en una placa de 96 pocillos de fondo redondo con un VSR A titulado para optimizar el rango de inhibición para cada muestra de suero. Las mezclas resultantes se incubaron durante 20 minutos a 33 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % para mantener el pH.

Las mezclas de sueros-inhibidor-virus se colocaron a continuación en placas de 96 pocillos de fondo plano sembradas previamente con células Vero, y se incubaron durante 2 horas a 33 °C antes de la adición de 160 µl de medio. Las placas se incubaron durante 5-6 días a 33 °C atmósfera de CO₂ al 5 % hasta el ensayo de inmunofluorescencia para la detección de la titulación de NI. Después de la fijación durante 1 hora con paraformaldehído al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS), las placas se bloquearon con leche al 2 %/PBS y tampón de bloqueo. Se añadió anticuerpo de anti-VSR de cabra (Biodesign Internation; 1:400) a cada pocillo sin aclarar y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Las muestras se lavaron 2x con PBS y se añadió IgG-FITC anti-cabra (Sigma, 1:400) en tampón de bloqueo a los portillos. Las placas se incubaron de nuevo durante 2 horas a TA y se lavaron 2X como anteriormente antes de la lectura. Un pocillo se consideró positivo cuando se detectaba sincitio fluorescente ≥ 1. Los cálculos de la dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 % (TCID50) se realizaron usando el procedimiento de Spearman-Karber (SK) y los porcentajes de NI se calcularon como sigue a continuación: [(titulación de Neut de 0 µg/ml de inhibidor - titulación de Neut de 25 µg/ml de inhibidor)/titulación de Neut de 0 µg/ml de inhibidor] x 100. Los resultados a modo de ejemplo mostrados en la FIG. 3 indican que PreF es superior a FG en NI en 16/21 donantes sometidos a ensayo.

Ejemplo 5: El antígeno de PreF es inmunogénico

Para demostrar la inmunogenicidad del antígeno PreF, los ratones inmunizaron dos veces IM a intervalos de dos semanas con preF (6,5, 3,1, 0,63, 0,13, y 0,025 µg/ml) y una adyuvante de Th1 que contenía 3D MPL y QS21 a 1/20 de la dosis humana ("AS01E") o preF (1, 0,2 y 0,04 µg/ml) y una adyuvante de Th1 que contenía 3D MPL y alum a 1/10 de la dosis humana ("AS04C") y el suelo se recogió tres semanas más tarde.

Las titulaciones de anticuerpo de IgG específico de antígeno se determinaron en muestras de suero combinadas mediante ELISA de acuerdo con procedimientos convencionales. En resumen, las placas de 96 pocillos se revistieron con VSR A inactivado purificado, VSR B y proteína homóloga de preF y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las muestras de suero se diluyeron en serie en tampón de bloqueo comenzando a una concentración inicial de 1:50, junto con IgG de ratón purificada (Sigma, ON) a concentraciones de partida de 200 ng/ml y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó con IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, ON). Como sustrato para HRP se usó 3,3A,5,5A-tetrametilbencidina (TMB, BD Opt EIATM, BD Biosciences, ON). Se añadieron 50 µl de H₂SO₄ 1 M a cada pocillo para parar la reacción. Los valores de absorbancia para cada pocillo se detectaron a 450 nm con un lector de microplacas de Molecular Devices (Molecular Devices, USA).

Los resultados representativos detallados en las FIGS. 4A y 4B muestran que algunas titulaciones fuertes se inducen tanto frente a VSR A como a VSR B después de inmunización con antígeno de preF.

Ejemplo 6: PreF induce anticuerpos de neutralización

La presencia y cantidad de anticuerpos de neutralización se evaluó en muestras de suero de ratones inmunizados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Los sueros combinados de animales inmunizados se diluyeron en serie desde una dilución de partida de 1:8 en medios de VSR en placas de 96 pocillos (20 µl/pocillo). Los pocillos de control contenían medio de VSR solamente, o anticuerpo anti-VSR de cabra a 1:50 (Biodesign international). Se añadieron 500-1000 dosis infecciosas de una cepa A o B del VSR representativa a los bolsillos, y las placas se incubaron durante 20 minutos a 33 °C, CO₂ al 5 %, antes de transferir la mezcla a placas de fondo plano de 96 pocillos sembradas previamente con 1 x 10⁵ células/ml de células Vero. Las células se incubaron durante aproximadamente 2 horas a 33 °C, CO₂ al 5 %, antes de incubación durante 5-6 días a la misma temperatura. Los sobrenadantes se retiraron; las placas se lavaron con PBS y las células de adherencia se fijaron con paraformaldehído al 1 % en PBS durante 1 hora, seguido de inmunofluorescencia indirecta (IFA) usando un anticuerpo primario anti VSR de cabra e IgG-FITC anti-cabra para detección.

Los resultados representativos mostrados en las FIGS 5A y 5B, respectivamente, demuestran que los anticuerpos de neutralización significativos frente a ambas cepas del VSR se detectan en sueros de animales inmunizados con preF.

Ejemplo 7: PreF protege frente a la estimulación con VSR

Los ratones se inmunizaron dos veces IM a intervalos de dos semanas como se ha descrito anteriormente, y se estimularon tres semanas después de la segunda inyección con VSR A. La protección frente al VSR se evaluó mediante la medida del virus presente en los pulmones después de la estimulación. En resumen, los pulmones de animales inmunizados se extrajeron de forma aséptica después de eutanasia y se lavaron en medio de VSR usando 2 volúmenes de 10 ml/pulmón en tubos de 15 ml. A continuación, los pulmones se pesaron y homogeneizaron de forma individual en medio de VSR con un homogeneizador Potter automatizado (Fisher, Nepean ON), y se centrifugaron a 2655 x g durante 2 minutos a 4 °C. El virus presente en los sobrenadante se tituló mediante diluciones serie (ocho replicados comenzando a 1:10) en una monocapa de células Vero (ATCC n.º CCL-81) sembradas previamente en placas de 96 concilios y se incubó durante 6 días. El VSR se detectó mediante IFA indirecto después de fijación en paraformaldehído al 1 %/PBS a pH 7,2, con anticuerpo primario anti-VSR de cabra y anticuerpo secundario de IgG anti-cabra etiquetado con FITC.

Los resultados representativos en las FIGS. 6A y B demuestran que las dosis iguales o superiores a 0,04 µg cuando se administran en presencia de adyuvante provocan una fuerte protección frente al VSR.

Ejemplo 8: PreF no induce reclutamiento pulmonar de eosinófilos después de estimulación

Para evaluar el potencial del antígeno PreF para provocar enfermedad exacerbada después de inmunización y estimulación posterior, los grupos de ratones (5 ratones/grupo) se inmunizaron dos veces cada uno con (a) 10 µg de preF tratado con gluteraldehído, (b) 10 µg de preF o (c) 10 µg de FG sin adyuvante. Los ratones se estimularon con VSR A 3 semanas después de estimulación y el lavado broncoalveolar (BAL) se realizó 4 días después de la estimulación. Los infiltrados de leucocitos totales en BAL se enumeraron por ratón así como enumeraciones diferenciales (300 células) basándose en la morfología celular de macrófagos/monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos.

Los números de células totales se multiplicaron mediante porcentajes diferenciales de eosinófilos para cada animal. Las medias geométricas se representan por grupo con límites de confianza de un 95 %. Los resultados representativos mostrados en la FIG. 7 demuestran que los eosinófilos no se reclutan a los pulmones después de inmunización con preF y estimulación. Además, estos resultados sugieren que la naturaleza soluble del antígeno preF, en comparación con una forma de preF agregada de forma deliberada (tratamiento con gluteraldehído) o antígeno de FG (agregado de forma natural) no favorece a los eosinófilos.

Ejemplo 9: Inmunogenicidad de antígeno de PreF formulado con diluciones de un adyuvante de emulsión de aceite en agua

Los ratones recibieron 250 ng de preF formulado con en la adyuvante de aceite en agua a modo de ejemplo, AS03A, a 1/10 de la dosis "completa" humana (AS03A) de 10,70 mg de escualeno, 11,88 mg de DL-α-tocoferol, 4,85 mg de polisorbato 80, 1/2 dosis (AS03B), ¼ de dosis (AS03C), o sin adyuvante.

Los ratones de control recibieron AS03A solo o PBS. Los ratones se inmunizaron los días 0 y 14. La extracción y estimulación de esplenocitos en sangre se realizó el Día 39 (25 días después de la dosis 2). Los pulmones se homogeneizaron para valoración de RSV 4 días después de la estimulación.

Las titulaciones de anticuerpo de IgG específico de antígeno se determinaron en muestras de suero individuales mediante ELISA. En resumen, las placas de 96 pocillos se revistieron con VSR A inactivado purificado y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las muestras de suero se diluyeron en serie en tampón de bloqueo comenzando a 1:200, junto con IgG de ratón purificada (Sigma, ON), a concentraciones de partida de 200 ng/ml y se incubaron durante 2 h a 37 °C. El anticuerpo unido se detectó con IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de

rábano picante (HRP) (Sigma, ON). Como sustrato para HRP se usó 3,3A,5,5A-tetrametilbencidina (TMB, BD Opt EIA/TM, BD Biosciences, ON). Se añadieron 50 μ l de H₂SO₄ 1 M a cada pocillo para parar la reacción. Los valores de Absorbancia de cada pocillo se detectaron a 450 nm con un lector de microplacas de Molecular Devices (Molecular Devices, USA). Los resultados se ilustran en la FIG. 8. La concentración de la IgG anti-VSR de aproximadamente 250.000 ng/ml se observó en suero de ratones inmunizados con preF en combinación con AS03A, AS03B o AS03C, mientras que se observó muy poca (1828 ng/ml) en suero de ratones inmunizados con preF solo.

Los sueros combinados de animales inmunizados se diluyeron en serie a partir de una dilución de partida de 1:8 en medio de VSR en placas de 96 pocillos (20 µl/pocillo). Los pocillos de control contenían medio de VSR solamente o anticuerpo anti-VSR de cabra a 1:50 (Biodesign international). La cepa del VSR Largo se añadió, las placas se incubaron durante 20 minutos a 33 °C y la mezcla se transfirió a placas de fondo plano de 96 pocillos sembradas previamente con 1×10^5 células/ml de células Vero. Después de 5-6 días a la misma temperatura, los sobrenadantes se retiraron; las placas se lavaron con PBS y las células de adherencia se fijaron con paraformaldehído al 1 % en PBS durante 1 hora, seguido de inmunofluorescencia indirecta (IFA). La FIG. 9 muestra que independientemente de la cantidad de AS03 administrado en combinación con preF, las titulaciones de anticuerpo de neutralización del VSR permanecían iguales (~ 11 log2), mientras que la titulación del anticuerpo de neutralización del VSR en los ratones inmunizados sin AS03 era significativamente menor (~6 log2).

Los pulmones de los animales inmunizados se extrajeron de forma aseptica después de eutanasia y se lavaron en medio de VSR usando 2 volúmenes de 10 ml / pulmón en tubos de 15 ml. A continuación se pesaron y se homogeneizaron de forma individual en medio del VSR con un homogeneizador Potter automatizado (Fisher, Nepean ON), y se centrifugaron a 2655 x g durante 2 minutos a 4 °C. El virus presente en los sobrenadantes se tituló. En resumen, los homogenados del pulmón se diluyeron en serie en ocho replicados comenzando a un 1:10 en una monocapa de células Vero (ATCC n° CCL-81) sembradas previamente en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 5-6 días. El VSR se detectó mediante IFA indirecto. La FIG. 10 ilustra resultados que demuestran que no se observaba diferencia en la protección entre ratones inmunizados con pref en combinación con AS03A, AS03B o AS03C, mientras que se observaba menos protección en ratones inmunizados en ausencia de AS03. Estos resultados demuestran que el antígeno PreF se puede formular a través de un amplio intervalo de concentraciones de adyuvante para producir una composición que provoca una respuesta inmune frente al VSR.

Istado de secuencias

SEQ ID NO: 1
30 Secuencia de nucleótidos que codifica la Cepa de proteína de Fusión de referencia del VSR con N.º de Referencia en GenBank U50362

atggagggtgctaattcctcaaagcaaatttgcattaccacaatcctcactgcagtcacatggtttgcttcgt
gtcaaaaacatcaactgaagaattttataactcaacatgcagtcagtagcaaaaggctatcttagtgctctgag
aactgggttggtataccagtgttataactatagattaagtaatatacaaggaaaataagtgtaatggAACAGAT
gctaaggtaaaattgataaaacaagaatttagataataaaaatgcgttaacagaattgcagttgtctcatgc
aaagcacccagcaacaaacaatcgagccagaagagaactaccaagggttatgaattatacactcaaaatgcc
aaaaaaaaaccaatgttaacattaaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggttttgttaggtgtggatctg
caatcgccagtgccgttgcgttatctaaggccctgcacctaagggaaagtgaacaagatcaaaagtgcct
actatccacaaacaaggctgttagtcagttatcaaattggagtttagtgcttaaccagcaaaagtgttagac
aaaaactatataaaaaacaattgttacctattgttaacaaagcaagctgcagcatatcaaataatagcaactg
tatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagattaccagggatttagtgtaaggcagggtgtact
acacctgttaagcacttacatgttaactaataatgttaatttgcattatcaatgatatgcctataacaaatg
atcagaaaaaggtaatgtccaaacaatgttcaaaatgttagacagcaaaaggttactctatcatgtccataataaa
agaggaagtcttagcatatgttacaattaccactatgtgttataagatacacccctgttggaaactacac
acatccccctatgtacaaccaacacaaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaactgacagagggtgtt
ctgtgacaatgcaggatcagtagtcttcccaacagctgaaacatgtaaagtcaatcaaattgcaggatatt
tgtgacacaatgaacagtttaacattaccaggtaactctgcaatgttagcatattcaaccccaat
atgattttaaaattatgacttcaaaaacgatgttaagcagctccgttatcacatcttaggagccatttggt
atgctatggcaaaacaaatgtacagcatccaataaaaatgttggaaatcataaagacattttctaacgggtgc
gatatgtatcaaataaagggggtggacactgtgtgttaggttaacacattatattgtaaaaaaggcaagaagg
taaaaggctctatgtaaaaggtaaccaataataaatttctatgacccttagtattccctctgtatgtatt
gtgcatcaatatctcaagtcaacgagaagattaacagagccctagcatttattgttaatccgtatgtatt
tacataatgttaatgttggtaatccaccataatcatgataactactataattatgtttaggtattatgttaat
attgttatcttaattgtgttggactgtcttatactgttaaggccagaagcacccaggtcacactaagaaag
atcaactqagtqqtataatattqtcatttaqtaactaa

SEQ ID NO: 2

Secuencia de aminoácidos de la Cepa A2 de precursor F0 de la proteína F de referencia del VSR con N.^o de Referencia en GenBank AAB86664

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
DAKVKLICKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNNAKKTNTVLSKKRKRRFLGFLLGV
GSAIASGVAVSKVLHLEGEVNMKIKSALLSTNKAVVSLSGVSVLTSVKLDLKNYIDKOLLPIVNKQSCSISN
IATVIEFQQKNNRILLETREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYI
MSIIKEEVVLAYVVQLPLYGVIDTPCWLHTSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV
QSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSVITSLGIAVSCYGKTKCTASNKNRGII
KTFSGNCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLA
FIRKSDELLHNVNAGKSTINIMITTIIIVILSLIAVGLLLCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

5

SEQ ID NO: 3

Secuencia de nucleótidos que codifica la Cepa Larga de la proteína G de referencia del VSR

Atgtccaaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaagacctggacactctcaatcatttatta
ttcatatcatcggttatataagttaatcttaatctatagcacaaatcacattatccattctggcaatg
ataatctcaacttcacttataattacaggcatcatattcatagcctcgcaaaccacaaagtcacactaaca
actgcaatcatacaagatgcaacaagccagatcaagaacacaaccccacataccactcactcaggatcctcag
cttggaatcagttctccaatctgtctgaaattacatcacaaaccaccataacttagttcaacaacacca
ggagtcaagtcaaacctgcaacccacaacagtcaagactaaaaacacaacaacacacacacccacccagg
aagcccactacaaaacaacgcacaaacaaaccaccaaaacaaaccataatgatttcacttcgaagtgttt
aacttgtaccctgcagcatatgcagcaacaatccaacctgtctggctatctgcaaaagaataccacaaa
aaaccaggaaagaaaaccaccaccaagctcacaaaaaccaacccatctcaagacaacccaaagatctcaaa
cctcaaaccaactaaaccaaccaagaatccaccaccaagccacagaagagccaaacatcaacaccaccaaa
acaaacatcacaactacactgctcaccaacaacaccacagggaaatccaaaactcacaagtcaaatggaaacc
ttccactcaacctccgcaggcaatctaagcccttctcaagtctccacacatccgagcaccatcacaa
ccctcatctccacccaacacaacacgcccagtag

SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de la proteína G de referencia del VSR

MSKNKDQRTAKTLEKTWDTLNHLLFISSGLYKLNLSIAQITLSILAMIISTSLIITAIIFIASANHKVTLT
TAIIQDATSQIKNTTPTYLTQDPQLGISFSNLSEITSQTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTQTQPS
KPTTKQRQNKPNNDFHEVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTKPTKKPTFKTTKDLK
PQTTKPKEVPTTKPTEEPTINTTKTNITTLNTNTGNPKLTSQMETFHSTSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQ
PSSPPNTTRQ

10

SEQ ID NO: 5

Secuencia de nucleótidos de análogo de PreF optimizado para CHO

```

aagcttgcaccatggagctgctgatcctaaaaaccaacgcacatcaccgcacatcctggcccccgtgaccctg
tgcttcgcctcctcccaagaacatcaccgaggagtctaccagtccacatcgccgtgtccaaagggtac
ctgtccgcctgcggaccggctgtacacccctcgatcaccatcgagctgtccaaacatcaaggaaaacaag
tgcaacggcaccgacgccaaggtaagactgatcaagcaggagctggacaaggtaacaagagcgcgtgaccgaa
ctccagctgatcgactccacccctgcccaccaacaacaaggtaatcttctgggcttcctgtctggcgtggctcc
gccatcgccctccggcatcgccgtgagcaaggtaatcgacactggagggcgaggtaacaagatcaagagcgc
ctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaaacggcgtgtccgtgtgacatccaagggtctggat
ctgaagaactacatcgacaaggcagactgctgcctatcgtaacaaggcagtcctgtctccatctccaaacatcgag
accgtgatcgacttccagcagaagaacaaccggctgtggagatcaccgcgagttctccgtgaacgcgcgc
gtgaccacccctgtgtccacccatgtgatcgaccactcccgagctgtgtccctgtatcaacgacatgcctatc
accaacgaccagaaaaaaactgatgtccaaacacgtgcagatcgccggcagcgtctacagcatcgatgac
atcatcaaggaagagggtctggctacgtggcagactgcctctgtacggcgtgatcgacacccctgtgg
aagctgcacacactccccctgtgcaccaccaacaaggaggctccaaacatcgctgaccggaccgac
cggggctggtaactgcgacaacgcggctccgtgtcccttccctgtggccgagacctgcaagggtgcagtcc
acccgggttctgcgacaccatgaaactccctgaccctgcctccgaggtgaaacctgtgcaacatcgacatc
ttcaaccccaagtagactgactgaaatcatgaccagaagaccgcgtgtccctccagcgtgatcactccctg
ggcgccatcgtgtccctgactggcaagaccaagtgcaccgcctccaaacaagaaccgggaatcatcaagacc
ttctccaaacggctgcgactacgtgtccaaataaggcggtggacaccgtgtccgtggcaacacactgtactac
gtgaataaggcaggaggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgaccctgtgg
ttccctccgacgagttcgacccctccatcagccaggtgaaacgagaagatcaaccagttccctggccctcata
cggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcgtccaaatctaccacatc
gagaacgagatcgcccgatcaagaagctgatcgccgaggcctgataatctaga

```

SEQ ID NO: 6

Secuencia de aminoácidos de análogo de PreF

5

```

MELLILKTNIAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSTVITIELSNIKENKCNGT
DAKVLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLGVGSIAISGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
NKAVVSLNSNGVSVLTSKVLIDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSIISNIETVIEFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTTP
VSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSTIKEEVILAYVQLPLYGVIDTPCWKLHT
SPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNIDIFNPK
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE I
ARIKKLIGEA

```

SEQ ID NO: 7

Secuencia de nucleótidos que codifica PreFG_V1 optimizado para CHO

aagcttgcaccatggagctgtatcctcaagaccaacgcacccatcaccgcacatcctggccgtgaccctg
 tgcttcgcctctcccagaacatcaccgaagagtttaccatcgccatctgtccgcgtgtccaagggtac
 ctgtccgcctgcggaccggctggtaacacctccgtatcaccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaag
 tgcaacggcaccgacgccaaggtaagctgtatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgcgtgaccga
 ctccagctgtatgcagtccacccctgccaccaacaagaagaatgtttctggcttctgtggcgtggc
 tccgcacatgcctccggcatgccgtgagcaagggtgtccatgtccacccgtgtccgtgtgacccatcaagg
 gcccgtgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccacccgtgtccgtgtgacccatcaagggtctg
 gatctgaagaactacatcgacaaggcagctgtccatgtgaacaaggcagtcctgtccatctcaacatc
 gagaccgtgatcgagggtccacccgtgtccatgtccacccgtgtccatgtgacccatccgtgaccc
 ggcgtgaccacccctgtgtccatgtccacccgtgtccatgtgacccatccgtgacccatccgtgaccc
 atcaccaacgaccaaaaaaaagctgtatgtccaccaacgtgcagatgtgcggcagcgtccatcagcatcatg
 agcatcatcaaggaagaagtccgtggctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccctgc
 tggaaagctgcacacccccctgtgcaccaacacaaaagagggctccacatctgcctgaccggacc
 gaccgggctgtactgcgacaacgcggctccgtgccttcccttgccgagacctgcaagggtcag

tccaaacgggtgttctgcgacaccatgaactccctgaccctgcctccgaggtgaacctgtgcaacatcgac
 atcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgcgtgtccctccagcgtgatcacctcc
 ctggcgccatcgtgtccctgtacggcaagaccaaggtaacccgcctccaacaagaaccggaaatcatcaag
 accttctccaacggtgcgactacgtgtccataaaaggcggtggacacccgtgtccgtggcaacacactgtac
 tacgtgaataaggcaggaaaggcaagagccgtgtacgtgaaggcgagccatcatcaacttctacgaccctctg
 gtgttccctccgacgaggatccgacgcgtccatcagccaggtaacgagaagatcaaccaggccctggccctc
 atccggaaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatccgtccaaaatctaccac
 atcgagaacgagatcggccgatcaagaagactgtatcgccggaggctggccgtctggccggcggccgtcc
 aagcggcggcagaacaagccctctaacaagcccaacaacgacttccacttcgagggtgtcaacttcgtgcct
 tgctccatctgtccaccaacccctacccgtgtccgtggccatctgcaagagaatcccaacaagaaggcctgcaag
 aaaaccaccaccaaggctaccaagaaggcctacccgtacccatcaagaccaccaagaaggcaccatcagaccaca
 aagccataaggaagtgcaccaaccaccaaggcaccaccatcaccactgataatcta

SEQ ID NO: 8

Péptido PreFG_V1 para CHO

5

MELLILKTNIAITAILAAVTLFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGT
 DAKVKLIKQELDKYKSATTELQLMQSTPATNNKKFLGFLGVGSIAISGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLS
 TNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLTEITREFSVNAGVTT
 PVSTYMLTNSELLSLLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVILAYVQLPLYGVIDTPCWKLH
 TSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLNCNIDIFNP
 KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVVGNTLYVNK
 QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE
 IARIKKLIGEAGGSGGGSKQRQNKPNNDFHEVFNFVPCSICSNPTCWAICKRIPNKKPGKTTT
 KPTKKPTFKTTKDHKPQTTKPKEVPTTK

SEQ ID NO: 9

Secuencia de nucleótidos que codifica PreFG_V2 optimizado para CHO

```
aagcttgcaccatggagctgctgatcccaagacacaacgcacccatcaccgcgcattccgtggccgtgaccctg
tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagttctaccagtccacatgcgcgtgtccaaaggctac
ctgtccgcctcgcgacccggctggatcacccctccgtgatcaccatcgagctgtccaaacatcaaagaaaacaag
tgcaacgcacccacgcacggcaaggtaagctgatcaagcagcaggaactggacaagttacaagagcgcgtgaccgaa
ctccagctgatcgcgtccacccctgccaccacaacaagaagttctgggcttcgtgtccgtggccgtggc
tccgcacatcgccctccggatcgcgtgagcaagggtgctgcacccgtggagggcgaggtaacaagatcaagagc
gcctgtgtccaccacaaggccgtgggtccctgtccaaacggcggtgtccgtgtccatctccaaggtctg
gatctgaagaactacatcgacaaacgcacgtgtgcctatcgtaacaagcagtcgtccatctccaacatc
gagaccgtgatcgatccagcagaagaacaacccgtgtccacccatgtgacaaactccgagctgtctccgtgtcaacgac
ggcgtgaccacccctgtgtccacccatgtgacaaactccgagctgtccatctccaacatcgacatgcct
atcaccaacgacaaaaaaagctgatgtccaaacaacgtgcagatgtgcggcagcagtcgtacagcatcatg
agcatcatcaaggaagaagtcttggctacgtcgtgcagtcgtctgtacgggtgatcgacaccccttc
tggaaagctgcacacccccctgtgcaccaccaacacaaaaagagggttccaaacatctgcgtgaccggacc
gaccggggctggtaactgcgacaacgcggctccgtgtcccttcctggccgagacctgtcaagggtcag
tccaacccgggtgttctgcgacaccatgaaactccctgaccctgcctccgaggtgaaacctgtcaacatcgac
atcttcaaccccaagtgactgcaagatcatgaccaggcaagaccgtgtccctccgtgtccatctcc
ctggcgccatcggtccctgtacggcaagaccaactgcacccgtgtcccttcctggccgagacactgtac
accccttccaaacggctgcgactacgtgtccaaataagggcggtggacacccgtgtccgtggcaacacactgtac
tacgtgaataagcaggaaggcaagacggctgtacgtgaaggccgagcctatcatcaacttctacgacccttc
gtgttcccttcgacggacttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccactgcgtgtccatctcc
atccggaaagtccgacgagaactgtgcataacgtggaggacaagatcgaaagatccaaatctaccac
atcgagaacgagatcgcccgatcaagaagactgtatcgccgaggctggccgcaagcagccgagaacaagect
ccaaacaaacggccaaacacgttccacttcgagggtgttcaacttcgtgccttgccttgcacatcgac
cctacctgtggccatctgcagaaatccccacaaagaagcctggcaagaaaaccaccaccacaaagccatacc
aaaaagcttacatcaagaccaccaagaaggaccacacgcctcagaccacaaagcctaaggaaagtgcacacc
accaagcaccaccatcaccactgataatcta
```

SEQ ID NO: 10

5 Peptido PreFG_V2 para CHO

```
MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
DAVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKKFLGFLGVGSIAISGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLS
TNKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
PVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQ1VRQQSYSIMSIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLH
TSPLCTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPLAETCKVQSNSRVFCDTMNSLTPSEVNLCNIDI FNP
```

```
KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTKCTASNKNRGIIKTFNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNK
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE
IARIKKLIGEAGGKQRQNKPNNDFHEVNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTKPTKKPT
FKTTKKDHKPQTTKPKEVPTTK
```

SEQ ID NO: 11

Bulos superenrollados a modo de ejemplo (cremallera de isoleucina)
EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

10

SEQ ID NO: 12

Polinucleótido CHO2 del antígeno PreF

atggagctgcccacccatcctgaagaccAACGCCATCACCACCATCCTGCCGCCGTGACCCCTGTGCTTCGCCAGC
 agccagaacatcacGGGAGGTTCTACCAGAGCACGTGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAGCGCGCTG
 CGCACGGCTGGTACACGAGCGTGTACAGCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAGAACAGTCAACGCCACG
 GACGCGAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTGGACAAGTACAAGAGCAGCGCGTGCAGGAGCTGCAGCTG
 ATGCAGAGCACGCCGGCGACGAACAACAAGTTCTCGGCTTCTGCTGGCGTGGGAGCGCGATCGCAGC
 GGCATGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCAGGTAACAAGATCAAGTCCCGCTGCTGAGCACG
 AACAAAGGCGGTGAGCTGAGCAACCGCGTGCAGCGTGCAGCAGCAAGGTGCTGACCTGAAGAACACTAC
 ATCGACAAGCAGCTGCTGCCGATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACCGTGTACG
 TTCCAGCAGAAGAACACCGCCTGCTGGAGATCACCGGGAGTTCTCGTGAACCGCAGGCGTGCAGCACGCC
 GTGTCTACGTACATGTCAGCAACAGCGAGCTGCTCAGCCTGATCAACGACATGCCATCACGAACGACCAAG
 AAGAAGCTGATGAGCAACAACGTGAGCATCGTGCAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAG
 GAGGTGCTGGCATAACGTGGTGCAGCTGCCGTGTACGGCGTCATCGACACGCCCTGCTGGAAGGCTGCACACG
 AGCCCGCTGTGCACGACCAACACGAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCGTGACCGGGACGGACGGGGGCTGGTAC
 TGCGACAAACGCCGGCGAGCGTGCAGCTTCTCCGCTCGCGGAGACGTGCAAGGTGAGAGCAACCGCGTCTTC
 TGCGACACGATGAACACGCCGTGACGCTGCCGAGCGAGGTGAACCTGTCACACATCGACATCTCAACCCGAAG
 TACGACTGCAAGATCATGACGAGCAAGACCGATGTCAGCAGCGTGTACCGAGCCTCGCGCAGTCAG
 AGCTGCTACGGCAAGACGAAGTGACCGCGAGCAACAAGAACCGCGGATCATCAAGACGTTAGCAACCGC
 TGCGACTATGTGAGCAACAAGGGCGTGGACACTGTGAGCGTGGCAACACGCTGTACTACGTGAACAAAGCAG
 GAGGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCGATCATCAACTTCTACGACCCGCTGTGTCCCAGCGAC
 GAGTTCGACGCGAGCATCAGCCAAGTGAACGAGAAGATCAACCAAGAGCCTGGCGTTCATCCGCAAGAGCGAC
 GAGAAGCTGCACACGTTGGAGACAAGATCGAGGAGATCCTGAGCAAGATCTACCACATCGAGAACAGAGATC
 GCAGCGCATCAAGAAGCTGATCGCGAGGCGATCATCACCACATCACCATTGA

SEQ ID NO: 13

Polinucleótido del antígeno PreF con intrón

atggagctgctgatccctaaaaaccAACGCCATCACCACCATCCTGCCGCCGTGACCCCTGTGCTTCGCCCTCC
 TCCCGAGAACATCACCGAGGAGTTCTACCAGTCCACCTGCTCCCGTGTCCAAGGGCTACCTGTCGCCCTG
 CGGACCGGCTGGTACACCTCCGTGATCACCATCGAGCTGTCACATCAAGGAAAACAAGTCAACGCCAC
 GACGCCAAGGTGAAGCTGATCAAGCAGGAGCTGGACAAGTACAAGAGCAGCGCGTGCACCGAACCTCAGCTG
 ATGCAGTCCACCCCTGCCACCAACAACAAGTTCTGGCTTCTGCTGGCGTGGGCTCCGCCATCGCCTCC
 GGCATGCCGTGAGCAAGGTACGTGCTGGGACTTGTGTTCCTTTTTAATAAAAAGTTATATCTTTAAT
 GTTATATACATATTCTGTATGTGATCCATGTGCTTATGACTTTGTTATCATGTGTTAGGTGCTGCACC
 TGGAGGGCGAGGTGAACAAGATCAAGAGCGCCCTGCTGTCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGTCAC
 GCGTGTCCCGTGTGACCTCCAAGGTGCTGGATCTGAAGAAACTACATCGACAGCAGCTGCTGCCATCGTGA
 ACAAGCAGTCCGTCTCCATCTCAACATCGAGACCGTGTACGAGTTCCAGCAGAAGAACACCGGCTGCTGG
 AGATCACCCCGCAGTTCTCCGTGAACGCCGGCGTGCACCCCTGTGTCACCTACATGCTGACCAACTCCG
 AGCTGCTGCCCTGATCAACGACATGCTATCACCAACGACCAAGAAAAACTGATGTCCAACACGTCAG
 TCCTGCGCAGCAGTCCTACAGCATGAGCATCATCAAGGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGC
 CTCTGTACGGCGTGTACGACACCCCTGCTGGAAAGCTGCAACACCTCCCCCTGTGCACCAACACCAAGG
 AGGGCTCCAACATCTGCCGTACCCGGACCGACCGGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCTCGTGTCCCT
 CCCCTCTGGCGAGACCTGCAAGGTGCGACTTCAACCCGGTGTGCGACACCATGAACTCCCTGACCGCTGC
 CTTCCGAGGTGAACCTGTGCAACATCGACATCTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCGAGCAAGA
 CGACGCTGTCTCCAGCGTGTACGACCTCCGTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCG
 CCTCCAACAAAGAACCGGGGAATCATCAAGACCTTCTCAACGGCTGCGACTACGTGTCACCAATAAGGGCGTGG
 ACACCGTGTCCGTGGCAACACACTGTACTACGTGAATAAGCAGGAGGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCG
 AGCTATCATCAACTTCTACGACCCCTGTTGGTGTCCCTCCGACGAGTTCGACGCCCTACATCAGCCAGGTGA
 ACAGAGAAGATCAACCAAGTCCCTGGCCTTCATCCGAAAGTCCGACGAGAAGCTGCAACAGTGGAGGACAAGA
 TCGAGGAGATCCTGTCCAAAATCTACCATCGAGAACAGAGATEGCCCGGATCAAGAAGCTGATCGCGAGG
 CGGAGGTACCCACCATCACCACTGA

5

SEQ ID NO: 14

Secuencia sintética de engarce
GGSGGGSGGS

SEQ ID NO: 15

Sitio de escisión de furina
RARR

10

SEQ ID NO: 16

Sitio de escisión de furina
RKRR

SEQ ID NO: 17

Secuencia de Nucleótidos que codifica PreF_NGTL

```

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgcacatcctggcccccgtgaccctgtgcttcgcctcc
tcccagaacatcaccgaggagtttaccagtccacctgtcccgccgtgtccaagggtcacctgtccgcctc
cgaccgcgttgtacacccgtatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgcacggcacc
gacgccaagggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcgtgaccgaactccagctgctg
atgcagttccacccctgcccaccaacaagtttctggcttcgtgtccgggtgtgggtccgcctatcgctcc
ggcatcgccgtgagaagggtgtgcacccgtggagggtgtggatcaagatcaagagcgcctgtgtccacc
aacaaggccgtgtgtccctgtccaacccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtggatctgaagaactac
atcgacaacagcagctgtgcctatcgtaacaaggcgttccatcgatccaaacatcgagaccgtgatcgag
ttccagcagaagaacaaccggctgtggagatcaccggcgagtttccgtgtccgcgtgaccaccct
gtgtccacccatgtgtccatgtgtccatgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
aaaaaaactgtatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaa
gaggtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
tccccccgtgcaccaccaacaccaaggagggtccacatctgcctgaccggaccgaccggggctggtac
tgcgacaacgcggctccgtgtccctctccctgtggccgagacctgtcaagggtgcagtccaaaccgggigttc
tgcgacaccatgaactccctgaccctgcctccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
tacgactgcaagatcatgaccaggcaagaccgacgtgtccctccagcgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
tcctgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
tgcgactacgtgtccataaggccgtggacaccgtgtccgtggcaacacactgtactacgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
gagggcaagaggccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
gatgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcgtccaaatctaccacatcgagaacgagatc
gcccggatcaagaagctgatcgccgaggcc

```

SEQ ID NO: 18

5

Secuencia de aminoácidos de PreF_NGTL

```

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
DAKVKLICKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLGVSIAISGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
NKAIVSLSNGVSVLTSKVLSDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTP
VSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHT
SPLCTTNKTEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPSEVNLCNIDIFNPK
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSDEFADASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
ARIKKLIGEA

```

SEQ ID NO: 19

Secuencia de nucleótidos que codifica PreF_L112Q

```

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgcacatcctggcccccgtgaccctgtgcttcgcctcc
tcccagaacatcaccgaggagtttaccagtccacctgtcccgccgtgtccaagggtcacctgtccgcctc
cgaccgcgttgtacacccgtatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgcacggcacc
gacgccaagggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcgtgaccgaactccagctgctg
atgcagttccacccctgcccaccaacaagtttctggcttcgtgtccgggtgtgggtccgcctatcgctcc
ggcatcgccgtgagaagggtgtgcacccgtggagggtgtggatcaagatcaagagcgcctgtgtccacc
aacaaggccgtgtgtccctgtccaacccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
atcgacaacagcagctgtgcctatcgtaacaaggcgttccatcgatccaaacatcgagaccgtgatcgag
ttccagcagaagaacaaccggctgtggagatcaccggcagtttccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
gtgtccacccatgtgtccatgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccgtgtccacc
aaaaaaactgtatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaa

```

gaggtgctggctacgtggtcagctgcctctgtacggcgtatcgacaccccttgcggaaactgcacacc
 tccccctgtgcaccaccaacaccaaggaggcgtccaacatctgcctgaccggaccggggctggtac
 tgcgacaacgcggctccgtgtccttcccttcggccgagacactgcaaggtgcagtccaaaccgggtttc
 tgcgacaccatgaactccctgaccctgcctccggcggaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaag
 taacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtccctccagcgtatcacctccctggggccatcgt
 ccctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccgggaaatcatcaagacaccccttccaaacggc
 tgcgactacgtgtccaaataaggcgtggacaccgtgtccgtggcaacacactgtactacgtgaataagcag
 gagggcaagagcctgtacgtgaagggcggcggctatcatcaacttctacgacccttgcgtgttccctccgac
 gagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtccctggccttcatccgaaagtccgac
 gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatc
 gcccggatcaagaagctgatcgccgaggcc

SEQ ID NO: 20

Secuencia de aminoácidos de PreF_L112Q

MELLILKTNIAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKYGLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGT
 DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLLFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
 NKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNQKQSCSIISNIETVIEFQQKNNRLLITREFSVNAGVTTP
 VSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWKLHT
 SPLCTNTKEGSNICLRTDRGYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPESEVNLCNIDIFNPK
 YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVVGNTLYYVNKQ
 EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
 ARIKKLIGEA

5 SEQ ID NO: 21

Secuencia de nucleótidos que codifica PreF_NGTL L112Q

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgcacatccggccatcctggccgggtgaccctgtgttcgcctcc
 tcccagaacatcacccgagggttaccatcaccgtccacccgtgtccggccgtgtccaaagggttacctgtccgcctg
 cggaccggctggtaacacccgtgtccacccatcgagctgtcaacatcaaggaaaacaagtgcacggcacc
 gacgccaaggtaagctgateaaggcaggagctggacaagtacaagagcgcgggtgaccgaactccagctgctg
 atgcagtccacccctgcccaccaacaagttctggcttccatcgaggggttccatcgccatcgccatcgcc
 ggcattgcgttgatccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgcc
 aacaaggccgtgttccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgcc
 atcgacaaggatcgctgcctatcgtaacaaggcagtccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgcc
 ttccagcagaagaacaaccggctgtggagatcaccgcgagttctccatcgccatcgccatcgccatcgcc
 gtgtccacccatcgaccacactccgagctgtgtccctgtatcgaccacatcgctatcgaccac
 aaaaaactgtatcgaccacactcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgcc
 gaggtgtccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgccatcgcc
 tccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggttccaaacatctgcctgaccggaccggggctggtac
 tgcgacaacgcggctccgtgtcccttccctgtggccgagacactgcaaggtgcagtccaaaccgggtttc
 tgcgacaccatgaactccctgaccctgcctccggaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaag
 taacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtccctccagcgtatcacctccctggggccatcgt
 tcctgtacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccgggaaatcatcaagacaccccttccaaacggc
 tgcgactacgtgtcaataaggcgtggacaccgtgtccgtggcaacacactgtactacgtgaataagcag
 gagggcaagagcctgtacgtgaagggcggcggctatcatcaacttctacgacccttgcgtgttccctccgac
 gagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggaccctggccttcatccgaaagtccgac
 gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatc
 gcccggatcaagaagctgatcgccgaggcc

SEQ ID NO: 22

Secuencia de aminoácidos de PreF_NGTL_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTTSVITIELSNIKENKCNGT
DAKVKLICKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSIAISGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLST
NKAVVSLNSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLIEITREFSVNAGVTP
VSTYMLTNSELLSILINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVQLPLYGVIDTPCWKLHT
SPLCTTNKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPK
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVNQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
ARIKKLIGEA

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A.
 ID Biomedical Corporation of Quebec
 BAUDOUX, Guy J-M
 BLAIS, Normand
10 Rheault, Patrick
 RUELLE, Jean-Louis
 CYR, Sonya

15 <120> Antígenos recombinantes del VSR
 <130> VU62788-1 PCT

20 <150> 61/219.964
 <151> 24-06-2009
 <150> 61/334.568
 <151> 13-05-2010

25 <160> 22
 <170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1
 <211> 1697
 <212> ADN
 <213> virus sincitial respiratorio

 <400> 1

atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt	60
gttttgcttc tggtaaaaaac atcactgaag aattttatca atcaacatgc agtgcagtag	120
caaaggctat cttagtgctc tgagaactgg ttggtatacc agtgttataa ctatagatta	180
agtaatatca aggaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag	240
aattagataa atataaaaat gctgtAACAG aattgcagtt gctcatgcaa agcacccAGC	300
aacaaacaat cgagccagaa gagaactacc aaggTTATG aattatacac tcaaaatGCC	360
aaaaaaaaacca atgtAACATT aagcaagAAA aggAAAAGAA gatttCTTGG tttttGTTAG	420
gtgttggatc tgcaatcgCC agtggcgttG ctgtatctaa ggTCCTGCAC ctGAAGGGGA	480
agtgAACAAAG atcaaaAGTG ctctactatC cacaaACAAG gctgtAGTC gttatCAAAT	540
ggagttAGTG tcttaACCAG caaAGTGTta gacCTCAAAA actatATAGA aaACAATTGT	600
tacCTATTGT gaacaAGCAA agCTGCAGCA tatCAAATAT agcaACTGTA tagAGTTC	660
acaAAAAGAAC aacAGACTAC tagAGATTAC cAGGGAAATT agtGTTAAGC aggtGTAACT	720
acacCTGTAA gcACTTACAT GTTAACTAAT agtGAATTAT tGTCATTATC aatGATATGC	780
ctataACAAA tGATCAGAAA aAGTAAATGT CCAACAAATGT tcaAAATGTta gacAGCAAAG	840
ttACTCTATC atgtCCATAA tAAAAGAGGA agtCTTAGCA tatGTGTACA attACCACTA	900
tatGGTGTta tagataCACCC ctGTTGGAAA CTACACACAT CCCCTATGT acaACCAACA	960
caAAAGAAGG gtCCAAACATC tGTTAACAA gaACTGACAG aggtGGTACT gtGACAATGC	1020
aggatCAGTA tCTTCTTCC cacaAGCTGA AACATGTAAA gtCAATCAAATCAGTATT	1080
tgtgacacaa tgaacAGTT AACATTACCA agtGAAGTAA ACTCTGCAAT gttgacatAT	1140
tcaACCCAA ATATGATTGT AAAATTATGA CTTCAAAAAC gatGTAAGCA gtcCGTTAT	1200
cacATCTCTA ggAGCCATTG tGTCATGCTA tggCAAAACA aatGTAACAGC atCCAATAAA	1260
aatCgtGGAA tcataAAAGAC atTTCTAAC gggTGCgATA tGtATCAAAT aaAGGGGTGG	1320
acactGTGTC tGTaggTAAC acATTATATT atGAAAAAG caAGAAGGTA aaAGTCTCTA	1380
tgtAAAAGGT gaACCAATAA tAAATTCTA tgACCCCTAG tattCCCTC tGATGAATT	1440
gatGcatCAA tatCTCAAGT caACGAGAAg attAACAGAG CCTAGCATTt atTCGTAAT	1500
ccgatGAATT attACATAAT gtaAAATGCTG gtaATCCACC atAAATATCA tgATAACTAC	1560
tataATTATA tGtGATTATAG tAAATTGTT atCTTAATTG ctGTTGGACT gctCTTATAC	1620
tgtAAAGGCCA gaAGCACACCC agtCACACTA agAAAGATCA actGAGTGGT atAAATAATA	1680
ttGcATTAG taactaa	1697

<210> 2
<211> 574
<212> PRT
<213> virus sincitial respiratorio

<400> 2

ES 2 583 257 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 Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

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

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

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

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 897

<212> ADN

<213> virus sincitial respiratorio

<400> 3

atgtccaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagacctg ggacactctc	60
aatcatttat tattcatatc atcgggctta tataagttaa atcttaaatc tatagcacaa	120
atcacattat ccattctggc aatgataatc tcaacttcac ttataattac agccatcata	180
ttcatagcct cgccaascca caaagtcaaca ctasacaactg caatcataca agatgcaaca	240
agccagatca agaacacaaac cccaaacatac ctcactcagg atcctcagct tggaatcagc	300
ttctccaatc tgtctgaaat tacatcacaa accaccacca tactagctc aacaacacca	360
ggagtcaagt caaacctgca acccacaaca gtcaagacta aaaacacaaac aacaacccaa	420
acacaaccca gcaagcccc tacaaaacaa cgccaaaaca aaccacccaa caaacccaa	480
aatgattttc acttcgaagt gtttaacttt gtaccctgca gcataatgcag caacaatcca	540
acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaaac cagggaaagaa aaccaccacc	600
aaggctacaa aaaaaccaac cttcaagaca accaaaaaaag atctcaaacc tcaaaccact	660
aaacccaaagg aagtacccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccacccaa	720
acaacacatca caactacact gtcaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt	780
caaattggaaa ctttccactc aacccctcc gaaggcaatc taagcccttc tcaagtctcc	840
acaacatccg agcaccatc acaaccctca tctccacccca acacaacacg ccagtag	897

5
 <210> 4
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> virus sincitial respiratorio

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
 130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn
 145 150 155 160

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 Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 1566

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido PreF recombinante

10

<400> 5

aagcttgcca ccatggagct gctgatcctg aaaaccaacg ccataccgc catcctggcc	60
ggcgtgaccc tggcttcgc ctcccccag aacatcaccg aggagttcta ccagtccacc	120
tgcctccgccc tggccaaggg ctacotgtcc gcctgcgga ccggctggta cacctccgtg	180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaggaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaagggtg	240
aagctgatca agcaggagct ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg	300
atgcagtcac ccctgtccac caacaacaag tttctgggtt tctgtctggg cgtgggtcc	360
gccatcgcct ccggcatcgc cgtgagcaag gtgctgcacc tggagggcga ggtgaacaag	420
atcaagagcg ccctgtgtc caccaacaag gcctgtgtt ccctgtccaa cggcgtgtcc	480
gtgctgaccc ccaagggtgt ggatctgaag aactacatcg acaaggcgt gctgcctatc	540
gtgaacaagc agtcttgctc catctccaaatc gagagaccc tgatcgagtt ccaggcagaag	600
aacaacccgc tgctggagat cacccgcgag ttctccgtga acgccccgt gaccacccct	660
gtgtccaccc aatgctgac caactccgag ctgtgtccc tgataaacga catgcctatc	720
accaacgacc agaaaaaaact gatgtccaaac aacgtgcaga tcgtgcggca gcagtccctac	780
agcatcatga gcatcatcaa ggaagaggtg ctggcctacg tgggtcagct gcctctgtac	840
ggcgtgatcg acaccccttg ctggaagctg cacacctccc ccctgtgcac caccaacacc	900
aaggagggct ccaacatctg cctgacccgg accgaccggg gctggtaactg cgacaacgccc	960
ggctccgtgt cttttttccc tctggccgag acctgcaagg tgcaagtccaa ccgggtgttc	1020
tgcgacacca tgaactccct gaccctgcct tccgaggtga acctgtgcaaa catcgacatc	1080
ttcaacccca agtacgactg caagatcatg accagcaaga ccgacgtgtc ctccagcgtg	1140
atcacctccc tgggcgcct cgtgtctgc tacggcaaga ccaagtgcac cgccctccaaac	1200
aagaacccggg gaatcatcaa gacccctcc aacggctgca actacgtgtc caataaggc	1260
gtggacaccc tgccgtggg caacacactg tactacgtga ataaggcagga gggcaagagc	1320
ctgtacgtga agggcgagcc tatcatcaac ttctacgacc ctctggtgtt cccttccgac	1380
gagttcgacg cctccatcaag ccaggtaac gagaagatca accagtcctt ggccattcatc	1440
cggaaagtccg acgagaagct gataacgtg gaggacaaga tcgaggagat cctgtccaaa	1500
atctaccaca tcgagaacga gatcgcccg atcaagaagc tgatcgccga ggcctgataa	1560
tctaga	1566

<210> 6
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Antígeno PreF recombinante
 <400> 6

ES 2 583 257 T3

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

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

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

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

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

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu

ES 2 583 257 T3

85

90

95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
 245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
385 390 395 400

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

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

<210> 7

<211> 1855

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótidos del antígeno PreF-G quimérica

10

<400> 7

aagcttgcca ccatggagct gctgatcctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60
gccgtgaccc tgtgtttcgc ctcccccag aacatcaccg aagagttcta ccagtccacc 120
tgctccgccc tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg 180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaggtc 240
aagctgatca agcagggact ggacaaagtac aagagcgcccg tgaccgaact ccagctgctg 300

atgcagtcca	ccccgtccac	caacaacaag	aagtttctgg	gcttcctgct	gggcgtggc	360
tccgcatecg	cctccggcat	cgccgtgagc	aagggtgctgc	acctggaggg	cgaggtgaac	420
aagatcaaga	gcccctgtct	gtccaccaac	aaggccgtgg	tgtccctgtc	caacggcgtg	480
tccgtgctga	cctccaaggt	gctggatctg	aagaactaca	tcgacaagca	gctgtgcct	540
atcgtaaca	agcagtccctg	ctccatctcc	aacatcgaga	ccgtgatcga	gttccagcag	600
aagaacaacc	ggctgctgga	gatcacccgc	gagttctccg	tgaacgcccgg	cgtgaccacc	660
cctgtgtcca	cctacatgtct	gacaaactcc	gagctgctct	ccctgatcaa	cgacatgcct	720
atcaccaacg	accaaaaaaaa	gctgatgtcc	aacaacgtgc	agatcgtgcg	gcagcagtc	780
tacagcatca	ttagcatcat	caaggaagaa	gtcctggcct	acgtcgtgca	gtgcctctg	840
tacggcgtga	tgcacacccc	ttgcttggaa	ctgcacacct	ccccctgtg	caccaccaac	900
accaaagagg	gttccaaacat	ctgcctgacc	cggaccgacc	ggggctggta	ctgcgacaaac	960
gccggctccg	tgtcccttctt	ccctctggcc	gagacctgca	aggtgcagtc	caaccgggtg	1020
ttctgcgaca	ccatgaactc	cctgaccctg	ccttcggagg	tgaacctgtg	caacatcgac	1080
atcttcaacc	ccaagtacga	ctgcaagatc	atgaccagca	agaccgacgt	gtcctccagc	1140
gtgatcacct	ccctgggcgc	catcgtgtcc	tgctacggca	agaccaagtg	caccgcctcc	1200
aacaagaacc	gggaaatcat	caagacccctc	tccaaacggct	gcgactacgt	gtccaataag	1260
ggcgtggaca	ccgtgtccgt	gggcaacaca	ctgtactacg	tgaataagca	ggaaggcaag	1320
agcctgtacg	tgaaggcga	gcctatcatc	aacttctacg	accctctgg	gttcccttcc	1380
gacgagttcg	acgcctccat	cagccaggc	aacgagaaga	tcaaccagtc	cctggccctc	1440
atccggaagt	ccgacgagaa	gtgcataaac	gtggaggaca	agatcgaaga	gatctgtcc	1500
aaaatctacc	acatcgagaa	cgagatcgcc	cggtatcaaga	agetgatcgg	cgaggctggc	1560
ggctctggcg	gcagcggcgg	ctccaaggcag	cgccagaaca	agcctcctaa	caagccccac	1620
aacgacttcc	acttcgaggt	gttcaacttc	gtgccttgc	ccatctgtc	caacaaccct	1680
acctgcttgg	ccatctgcaaa	gagaatcccc	aacaagaagc	ctggcaagaa	aaccaccacc	1740
aagcttacca	agaagcctac	ttcaagacc	accaagaagg	accacaagcc	tcaagaccaca	1800
aagcttaagg	aagtgcacac	caccaagcac	caccaccatc	accactgata	atcta	1855

<210> 8

<211> 605

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido PreF-G químérico

10 <400> 8

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

ES 2 583 257 T3

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
130 135 140

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
145 150 155 160

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

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
180 185 190

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe
195 200 205

Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr
210 215 220

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp
225 230 235 240

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser
245 250 255

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val
260 265 270

Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His
 275 280 285

Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys
 290 295 300

Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val
 305 310 315 320

Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val
 325 330 335

Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu
 340 345 350

Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr
 355 360 365

Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile
 370 375 380

Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg
 385 390 395 400

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

Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys
 420 425 430

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
 435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
 450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
 465 470 475 480

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
 485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
 500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Gln Arg Gln
 515 520 525

Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe
530 535 540

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
545 550 555 560

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr
565 570 575

Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys
580 585 590

Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys
595 600 605

<210> 9

<211> 1834

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido PreF-G químérico

10 <400> 9

aagcttgc	ccatggagct	gctgatc	c	a	agaccaac	ccatcac	cg	catc	c	tg	gc	cc	60											
ccgtgac	cc	tgtgtt	cgc	c	tc	ctccc	ag	a	acat	cac	cg	a	agtt	cta	cc	ag	tc	cacc	120					
tgctcc	cc	tg	tccaa	agg	g	ctac	ctgt	cc	cc	tcg	gg	ta	cac	ctcc	gt	g	ta	cac	ct	tg	180			
atcaccat	cg	atc	gtccaa	cat	caa	aga	aa	a	aca	agt	g	ca	ac	gg	cac	cg	ga	c	cca	agg	gt	240		
aagctgat	ca	g	cag	g	aa	gt	ac	g	a	act	gg	ac	tg	cc	g	ta	ct	gt	ct	g	ct	300		
atgcag	tcc	ca	cc	ctge	cc	ac	ca	ca	ca	ag	ttt	ctgg	g	ctt	c	ct	gt	gt	cc	gt	gg	gc	360	
tccg	ccat	cg	c	ctccgg	cat	cg	cc	gt	g	ac	gt	tc	g	ac	ct	gg	ag	gg	cg	gt	gg	gc	420	
aagat	ca	ga	g	cc	cc	ct	gt	ct	gt	cc	ac	ca	ac	ca	cc	gt	gg	tg	cc	gt	gt	480		
tccgt	gt	ga	c	c	tcc	aa	gg	ttt	ctgg	gt	cc	ct	gt	tc	ca	ac	gg	cg	gt	cc	gt	540		
atcgt	ga	ac	a	gc	ag	tc	tc	tc	tc	ac	at	cg	at	cg	at	ca	cc	ac	cc	gg	cg	gt	600	
aaga	aca	acc	gg	ct	gt	tg	ga	tc	ac	cc	cc	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	660	
cctgt	gt	cc	c	c	ta	ca	at	at	ac	ac	ttt	ct	gt	ct	gt	cc	ct	gt	gt	cc	ct	gt	720	
atcacc	aa	ac	ac	cc	aa	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	780	
atcacc	aa	ac	ac	ac	aa	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	840	
tacagg	cat	ca	g	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	900	
accaa	ag	agg	gt	cc	aa	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	960	
gccgg	get	cc	tg	cc	ttt	cc	ct	gg	cc	g	ag	ac	ct	gt	ca	ac	cc	gg	gt	cc	tt	tt	1020	
ttct	cg	ca	cc	at	ac	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	1080
atctt	ca	ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1140
gtgat	ca	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1200
aaca	aga	aa	ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1260
ggcgt	gg	aa	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	cc	at	1320
agcct	gt	ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1380
gacgag	tt	cg	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1440
atccgg	aa	gt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1500
aaaat	ct	ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1560
ggca	ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1620
ttca	act	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	tc	1680
agaat	cccc	ca	aa	aa	gg	cc	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	1740
ttca	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	1800
acca	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	1834

<210> 10
<211> 598
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido PreF-G quimérico

5 <400> 10

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

ES 2 583 257 T3

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
 115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
 130 135 140

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
 145 150 155 160

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

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
 180 185 190

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe
 195 200 205

Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr
 210 215 220

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp
 225 230 235 240

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser
 245 250 255

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val
 260 265 270

Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His
 275 280 285

Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys
 290 295 300

Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val
 305 310 315 320

Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val
 325 330 335

Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu
 340 345 350

Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr
 355 360 365

Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile

ES 2 583 257 T3

370

375

380

Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg
385 390 395 400

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

Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys
420 425 430

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
465 470 475 480

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro
515 520 525

Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile
530 535 540

Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
545 550 555 560

Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr
565 570 575

Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys
 580 585 590

Glu Val Pro Thr Thr Lys
595

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cremallera de leucina GCN4 sustituida con isoleucina

<400> 11

Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn
1 5 10 15

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala
20 25

5

<210> 12

<211> 1563

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de PreF optimizada con codones

15 <400> 12

atggagctgc ccatacctgaa gaccaacgcc atcaccacca tcctcgccgc cgtgaccctg	60
tgttgcaca gcagccagaa catcacggag gagttctacc agagcacgtg cagcgccgtg	120
agcaagggtt acctgagcgc gctgcgcacg ggctggtaca cgagcgttat cacgatcgaa	180
ctgagcaaca tcaaggagaa caagtgcac ggcacggacg cgaaggtaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgcggtg acggagctgc agctgcttat gcagagcacg	300
ccggcgacga acaacaattt ctctggcttc etgctggcg tggcagcgc gatcgcgagc	360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagtcccg	420
ctgctgagca cgaacaaggc ggttgtgagc ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgacgagc	480
aagggtctcg acctgaagaa ctacatcgac aacgagctgc tgccgatcgt gaacaaggcag	540
agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg atcgatcttcc agcagaagaa caaccgcctg	600
ctggagatca cgccccggattt ctccgtgaac gcaggcgtga cgacgcccgt gtctacgtac	660
atgctgacga acagcgagct gctcagcctg atcaacgaca tgcggatcac gaacgaccag	720
aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc gtgcgcgcgc agagctacag catcatgagc	780
atcatcaagg aggaggtgtt ggcatacgtg gtgcagctgc cgctgtacgg cgtcatcgac	840
acgcctgtt ggaagctgca cacgagcccg ctgtgcacga ccaacacgaa ggagggcagc	900
aacatctgcc tgacgcggac ggaccggggc tggtaactgcg acaacgcggg cagcgtgagc	960
ttcttccccgc tcgcggagac gtgcaaggtg cagagcaacc gcttcttctt cgcacacgtat	1020
aacagcctga cgctgcccgag cgagggttac ctgtgcacca tcgacatctt caacccgaag	1080
tacgactgca agatcatgac gagcaagacc gatgtcagca gcagcgttat cacgagcctc	1140
ggcgcgatcg tgagctgcta cggcaagacg aagtgcacgg cgagcaacaa gaaccgcggc	1200
atcatcaaga cgttcagcaa cggctgcgcac tatgtgagca acaagggtt ggcacactgtt	1260
agcgtcggca acacgctgtt ctacgtgaac aacgaggagg gcaagagcct gtacgtgaag	1320
ggcgagccga tcatcaactt ctacgaccccg ctctgtttcc cgagcgcacga gttcgacgcgc	1380
agcatcagcc aagtgaacga gaagatcaac cagagcctgg cgttcatccg caagagcgcac	1440
gagaagctgc acaacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgagcaagat ctaccacatc	1500
gagaacgaga tcgcgcgcac caagaagctg atcggcgagg cgcatcatca ccatcaaccat	1560
tga	1563

<210> 13
 <211> 1685
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos Pre-F con intrón
 <400> 13

atggagctgc	tgatcctgaa	aaccaacgccc	atcacccgcca	tcctggccgc	cgtgaccctg	60	
tgcttcgcct	cctccccagaa	catcacccgag	gagttctacc	agtccacctg	ctccggcg	120	
tccaaaggct	acctgtccgc	cctgcccggacc	ggctggtaca	cctccgtat	caccatcgag	180	
ctgtccaaaca	tcaaggaaaa	caagtgcac	ggcacccgacg	ccaaggtgaa	gctgatcaag	240	
caggagctgg	acaagtacaa	gagcggcg	accgaactcc	agctgctgat	gcagtccacc	300	
cctgccacca	acaacaagtt	tctgggcttc	ctgctgggg	tgggctccgc	catcgccctcc	360	
ggeatcgccg	tgagcaaggt	acgtgtcg	acttgtgttc	ccctttttt	aataaaaagt	420	
tatatatcta	atgttatata	catatttc	gtatgtatc	catgtgat	tgactttgtt	480	
tatcatgtgt	ttaggtgctg	cacctggagg	gcgaggtgaa	caagatcaag	agcgccctgc	540	
tgtccaccaa	caaggccgtg	gtgtccctgt	ccaaacggcg	gtccgtgctg	acctccaagg	600	
tgctggatct	gaagaactac	atcgacaagc	agctgctg	tatgtgaac	aagcagtcct	660	
gctccatctc	caacatcgag	accgtgatcg	agttccagca	gaagaacaac	cggctgctgg	720	
agatcacc	cggatctcc	gtgaacgccc	gcgtgaccac	ccctgtgtcc	acctacatgc	780	
tgaccaactc	cgagctgctg	tccctgatca	acgacatg	tatcaccaac	gaccagaaaa	840	
aactgatgtc	caacaacgtg	cagatcg	ggcagcagtc	ctacagcatc	atgagcatca	900	
tcaaggaaga	ggtgctggcc	tacgtgg	agctgctct	gtacggcg	atcgacaccc	960	
cttgctggaa	gctgcacacc	tccccctgt	gcaccac	ccaaggag	ggctccaaca	1020	
tctgcctgac	ccggaccgac	cgggctgg	actgcgac	cgccgctcc	gtgtccttct	1080	
tccctctggc	cgagacctgc	aagg	tcgtc	ccatgac	accatgaa	1140	
ccctgacc	gtgaa	ctgt	gcaacatcg	catctcaac	cccaagta	1200	
actgcaagat	catgacc	aagacc	gtgtc	tccctgg	ccatcg	1260	
ccatcg	ctgctac	aagac	gac	ccatcg	caacaagaac	1320	
tcaagac	ctccaacggc	tg	ctact	tg	ggac	accgtgtcc	1380
tg	ggcaacac	actgtactac	gt	gataa	aggagg	1440	
agc	cttatcat	caacttctac	gacc	ctctgg	tgttcccttc	1500	
tc	agccagg	gaa	cgt	accgt	catccgg	1560	
ag	ctgcataa	atcaacc	act	ggctt	gaa	1620	
ac	cg	atcg	gat	ccat	ccatcg	1680	
act	ga	act	gatcg	ccat	ccatcg	1685	

<210> 14

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido enlazador sintético

10 <400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 4
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Motivo consenso de escisión de furina
10 <400> 15

Arg Ala Arg Arg
1

15 <210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Motivo consenso de escisión de furina
<400> 16

Arg Lys Arg Arg
1

25
<210> 17
<211> 1542
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

35 <400> 17

atggagctgc	tgatcctgaa	aaccaacgcc	atcaccccca	tcctggccgc	cgtgaccctg	60
tgcttcgcct	cctcccaagaa	catcacccag	gagtttctacc	agtccacactg	ctccggccgtg	120
tccaaagggt	acctgtccgc	cctgcggacc	ggctggtaaa	cctccgtgtat	caccatcgag	180
ctgtccaaaca	tcaaggaaaa	caagtgcAAC	ggcacccgacg	ccaagggtgaa	gtgtatcaag	240
caggagctgg	acaagtacaa	gagcgcgtg	accgaactcc	agctgtgtat	gcagtccacc	300
cctgccacca	acaacaagtt	tctgggttcc	ctgtggggcg	tgggtccgc	catacgccccc	360
ggcatacgccg	tgagcaaggt	gctgcacctg	gagggcgagg	tgaacaagat	caagagcgcc	420
ctgtgttcca	ccaacaaggc	cgtgggttcc	ctgtccaaacg	gcgtgtccgt	gtgtacccctcc	480
aagggtgtgg	atctgaagaa	ctacatcgac	aagcagctgc	tgcctatcgt	gaacaagcag	540
tcctgttcca	tctccaaacat	cgagaccgtg	atcgagttcc	agcagaagaa	caacccggctg	600
ctggagatca	ccccggagtt	ctccgtgaac	gcggggcgta	ccacccctgt	gtccacccat	660
atgtgtacca	actccggagct	gtgtccctg	atcaacgaca	tgcctatcac	caacgaccag	720
aaaaaaactga	tgtccaaaca	cgtcagatc	gtgcggcagc	agtcctacag	catcatgagc	780
atcatcaagg	aagagggtgt	ggttacgtg	gtgcagctgc	ctctgtacgg	cgtgtatcgac	840
accccttgcgt	ggaagctgca	cacccccc	ctgtgcacca	ccaacaccaa	ggagggctcc	900
aacatctgcc	tgacccggac	cgacccgggc	ttgtactgcg	acaacccgg	ctccgtgtcc	960
ttcttccttc	tggcccgagac	ctgcaaggtg	cagtccaaacc	gggtgttctg	cgacaccat	1020
aactccctga	ccctgccttc	cgaggtaaac	ctgtgcacca	tgcacatctt	caaccccaag	1080
tacgactgca	agatcatgac	cagcaagacc	gacgtgtcct	ccagcgtgtat	caccccttc	1140
ggcgccatcg	tgttctgtata	cggtcaagacc	aagtgcacccg	cctccaaacaa	gaacccggga	1200
atcatcaaga	ccttctccaa	cggctgcgac	tacgtgttcca	ataagggcgt	ggacaccgtg	1260
tccgtggca	acacactgtt	ctacgtgaat	aagcaggagg	gcaagagcct	gtacgtgaag	1320
ggcgagccta	tcatcaactt	ctacgaccct	ctgggtttcc	cttccgacga	gttcgacgcc	1380
tccatcagcc	aggtaacgca	gaagatcaac	gggacccctgg	ccttateeeg	gaagtccgac	1440
gagaagctgc	ataacgtgga	ggacaagatc	gaggagatcc	tgtccaaaat	ctaccacatc	1500
gagaacgaga	tcgccccggat	caagaagctg	atcggcgagg	cc		1542

<210> 18

<211> 514

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido PreF sintético

10

<400> 18

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

ES 2 583 257 T3

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
260 265 270

ES 2 583 257 T3

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
385 390 395 400

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

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gly Thr Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

<210> 19

<211> 1542

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido PreF sintético

5

<400> 19

atggagctgc	tgatcctgaa	aaccaacgcc	atcacccgcca	tcctggccgc	cgtgaccctg	60
tgcctcgctt	cctccccagaa	catcacccgag	gagttctacc	agtccacctg	ctccggccgtg	120
tccaaagggt	acctgtccgc	cctgcccggacc	ggctggtaea	cctccgttat	caccatcgag	180
ctgtccaaaca	tcaaggaaaa	caagtgcac	ggcacccgacg	ccaagggtgaa	gctgatcaag	240
caggagctgg	acaagtacaa	gagcgcgtg	accgaactcc	agctgttat	gcagtccacc	300
cctgcccacca	acaacaagtt	tctgggttcc	ctgcaggggcg	tgggctccgc	catgcctcc	360
ggcatacgccg	ttagcaaggt	gctgcacctg	gagggcgagg	tgaacaagat	caagagcc	420
ctgtgttca	ccaaacaaggc	cgtgggttcc	ctgtccaaacg	gcgtgtccgt	gctgacccctcc	480
aaggtgttgg	atctgaagaa	ctacatcgac	aaggcgtgc	tgcctatcgt	gaacaagcag	540
tctgttcca	tctccaaacat	cgagaccgtg	atcgagttcc	agcagaagaa	caaccggctg	600
ctggagatca	cccgcgagtt	ctccgtgaac	gcggcggtg	ccaccctgt	gtccacccat	660
atgtgtacca	actcccgagct	gctgtccctg	atcaacgaca	tgcctatcac	caacgaccag	720
aaaaaaactga	tgtccaaaca	cgtgcagatc	gtgcggcage	agtcetacag	catcatgagc	780
atcatcaagg	aagaggtgt	ggttctacgt	gtgcagctgc	ctctgtacgg	cgtgtatcgac	840
acccttgcgt	ggaagctgca	cacotcccc	ctgtgcacca	ccaaacaccaa	ggagggttcc	900
aacatctgcc	tgacccggac	cgacccggggc	tggtaactgcg	acaacccgg	ctccgtgtcc	960
ttcttccctc	tggccgagac	ctgcaaggtg	cagtccaaacc	gggtgttctg	cgacaccatg	1020
aactccctga	ccctgccttc	cgaggtgaac	ctgtgcacca	tgcacatctt	caaccccaag	1080
tacgactgca	agatcatgac	cagcaagacc	gacgtgttcc	ccagcgttat	cacccctcg	1140
ggccgcattcg	tgttctgtca	cggcaagacc	aagtgcaccc	cctccaaaca	gaaccgggg	1200
atcatcaaga	ccttctccaa	cggctgcgac	tacgtgttcc	ataagggcg	ggacaccgtg	1260
tccgtggca	acacactgta	ctacgttaat	aagcaggagg	gcaagacc	gtacgtgaag	1320
ggcgagccata	tcatcaactt	ctacgttcc	ctgggtgttcc	cttccgacga	gttcgacgccc	1380
tccatcagcc	aggtaacga	gaagatcaac	cagtccctgg	catttcatccg	gaagtccgac	1440
gagaagctgc	ataacgttga	ggacaagatc	gaggagatcc	tgtccaaaat	ctaccacatc	1500
gagaacgaga	tgcggccggat	caagaagatc	atcgcccgagg	cc		1542

10

<210> 20

<211> 514

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido PreF sintético

<400> 20

ES 2 583 257 T3

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Gln
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 225 230 235 240

ES 2 583 257 T3

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
385 390 395 400

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

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

<210> 21

<211> 1542

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido PreF sintético

10

<400> 21

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgaccctg	60
tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gagtttctacc agtccacctg ctccgcccgtg	120
tccaaaggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgcAAC qgcacccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgcgcgtg accgaactcc agctgtgtat gcagtccacc	300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcaggcgg tgggctccgc catcgccctcc	360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgc	420
ctgctgtcca ccaacaaggc cgtgggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacccctcc	480
aagggtgtgg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag	540
tcctgttcca tctccaaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg	600
ctggagatca cccgcgagtt ctccgtgaac gcccggcgtga ccacccctgt gtccacccat	660
atgctgacca actcccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag	720
aaaaaaactga tgtccaaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcttacag catcatgagc	780
atcatcaagg aagaggtgtct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac	840
accccttgcgtt ggaagctgca caccccccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtctcc	900
aacatctgcc tgaceccggac cgaccggggc tggtaactgcg acaacgcccgg ctccgtgtcc	960
ttcttccctc tggcccgagac ctgcaaggtg cagtccaaacc gggtgttctg cgacaccatg	1020
aactccctga ccctgccttc cgaggtgaac ctgtgcacca tcgcacatctt caaccccaag	1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtat cacctccctg	1140
ggcgccatcg tgcctgtata cggcaagacc aagtgcacccg cctccaaacaa gaaccgggg	1200
atcatcaaga ccttctccaa cggctgcgcac tacgtgttcca ataagggctt ggacaccgtg	1260
tccgtggca acacactgtat tacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag	1320
ggcgagccata tcatcaactt ctacgaccct ctgggtttcc ctccgcacga gttcgacgcc	1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg ctttcattccg gaagtccgac	1440
 gagaagctgc ataacgttga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc	1500
gagaacgaga tggcccgat caagaagctg atcggcgagg cc	1542

<210> 22

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido PreF sintético

10 <400> 22

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Gln
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser

ES 2 583 257 T3

195	200	205
Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn		
210	215	220
Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln		
225	230	235
240		
Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr		
245	250	255
Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln		
260	265	270
Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr		
275	280	285
Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu		
290	295	300
Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser		
305	310	315
320		
Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe		
325	330	335
Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys		
340	345	350
Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser		
355	360	365
Lys Thr Asp Val Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val		
370	375	380
Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly		
385	390	395
400		
Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly		
405	410	415
Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln		
420	425	430
Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr		
435	440	445
Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln		
450	455	460

ES 2 583 257 T3

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gly Thr Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

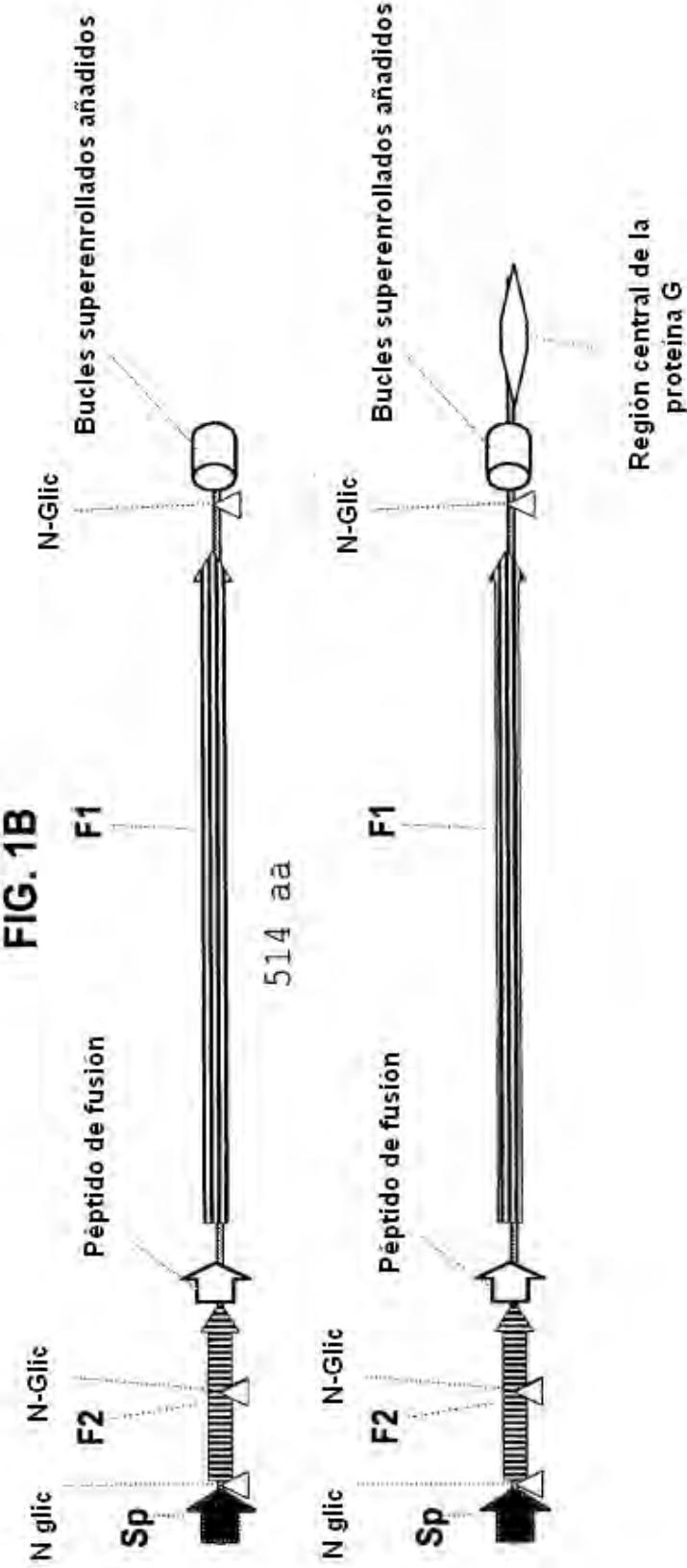
Glu Ala

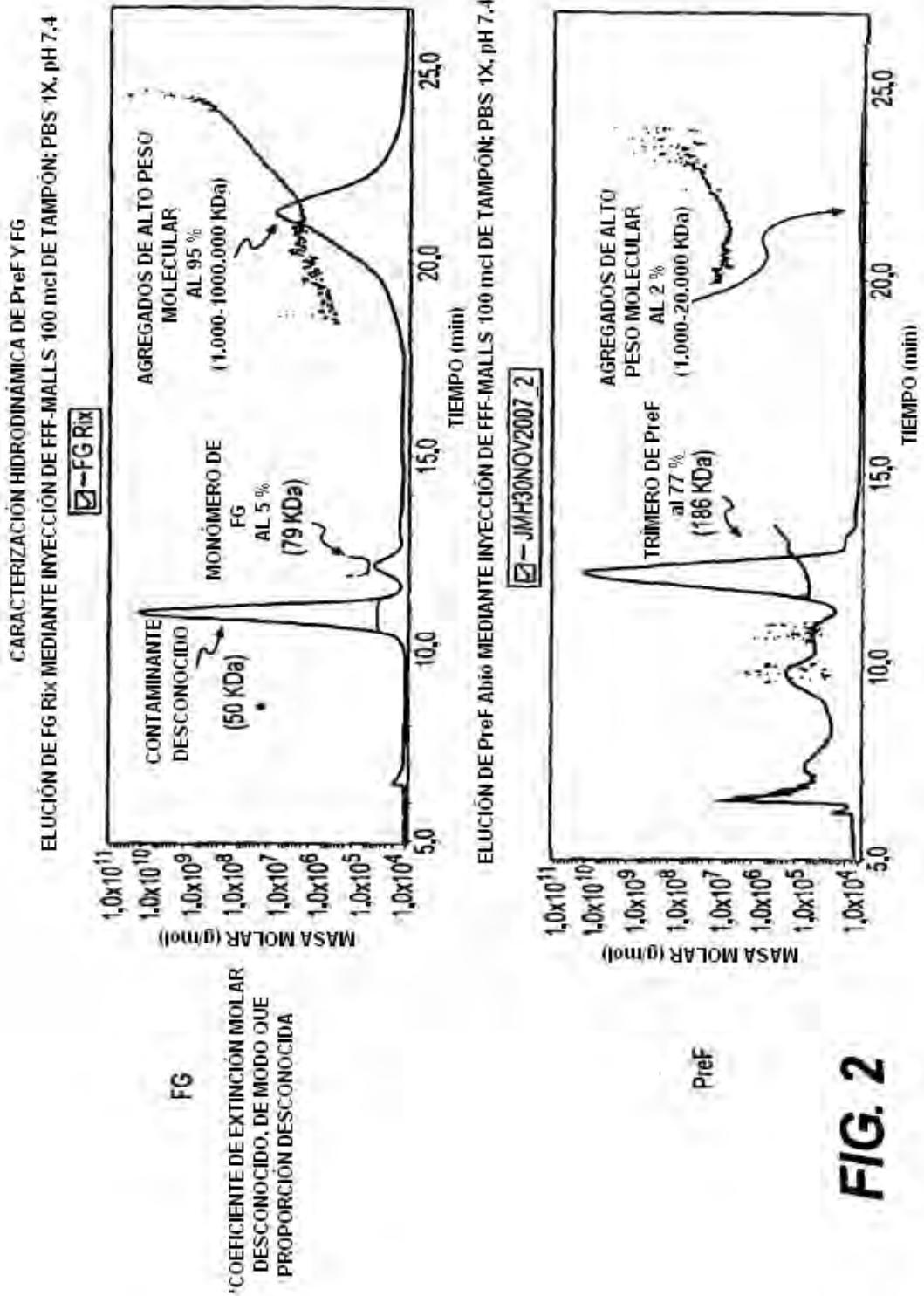
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antígeno del virus sincitial respiratorio recombinante (VSR) que comprende un polipéptido de la proteína F del VSR sin un dominio transmembrana, que comprende un dominio F₂ y un dominio F₁ de un polipéptido de la proteína F del VSR, en el que el polipéptido de la proteína F comprende al menos una modificación que aumenta la glicosilación, dicha al menos una modificación que aumenta la glicosilación comprende una sustitución en la que los aminoácidos que corresponden a las posiciones 500-502 de la SEQ ID NO: 2 se seleccionan entre: NGS; NGT.
- 10 2. El antígeno del VSR recombinante de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de la proteína F comprende al menos una modificación seleccionada entre:
- (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo;
 - (ii) una adición, supresión o sustitución de aminoácidos que elimina un sitio de escisión de furina en una posición que corresponde a los aminoácidos 105-109, una posición que corresponde a los aminoácidos 133-136, o en ambas posiciones que corresponden a los aminoácidos 105-109 y 133-136 del precursor de referencia de la proteína F (F₀) de la SEQ ID NO: 2;
 - (iii) una supresión de uno o más del dominio pep27; y
 - (iv) sustitución de lisina por la leucina presente en la posición 512 o adición de una lisina después del aminoácido que corresponde al resto 105 de la SEQ ID NO: 2 de referencia.
- 15 3. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el polipéptido de la proteína F soluble comprende el péptido de fusión intacto entre el dominio F2 y el dominio F1.
- 20 4. El antígeno del VSR recombinante de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la al menos una modificación comprende la adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo.
- 25 5. El antígeno del VSR recombinante de la reivindicación 4, en el que el dominio de trimerización heterólogo está colocado en posición C-terminal con respecto al dominio F₁.
- 30 6. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que comprende un dominio F2 y un dominio F1 sin sitio de escisión de furina de intervención.
- 35 7. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el dominio F₂ comprende al menos una parte de un polipéptido de la proteína F del VSR que corresponde a los aminoácidos 26-105 del polipéptido precursor de la proteína F de referencia (F₀) de la SEQ ID NO: 2.
- 40 8. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el dominio F₁ comprende al menos una parte de un polipéptido de la proteína F del VSR que corresponde a los aminoácidos 137-516 del polipéptido precursor de la proteína F de referencia (F₀) de la SEQ ID NO: 2.
- 45 9. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el antígeno del VSR se selecciona entre el grupo de:
- a) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 22;
 - b) un polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 21;
 - c) un polipéptido con una identidad de secuencias de al menos un 95 % con la SEQ ID NO: 22.
- 50 10. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el antígeno del VSR comprende un multímero de polipéptidos.
- 55 11. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el antígeno del VSR comprende un trímero de polipéptidos.
- 60 12. Una composición inmunogénica que comprende el antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 65 13. La composición inmunogénica de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 70 14. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 75 15. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 14, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre:
- a) una secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 21;
 - b) una secuencia de polinucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 22;
 - c) una secuencia de polinucleótidos con una identidad de secuencias de al menos un 95 % con la SEQ ID NO: 21, cuya secuencia de polinucleótidos no corresponde a una cepa del VSR de origen natural.

16. El uso del antígeno del VSR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el ácido nucleico de la reivindicación 15 en la preparación de un medicamento para tratar una infección por VSR.
17. El uso de reivindicación 16, en la que el medicamento se administra con el fin de tratar de forma profiláctica una infección por VSR.
- 5 18. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 para su uso como un medicamento.
19. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 para la prevención o tratamiento de una infección por VSR.

10

FIG. 1A**FIG. 1B**

**FIG. 2**

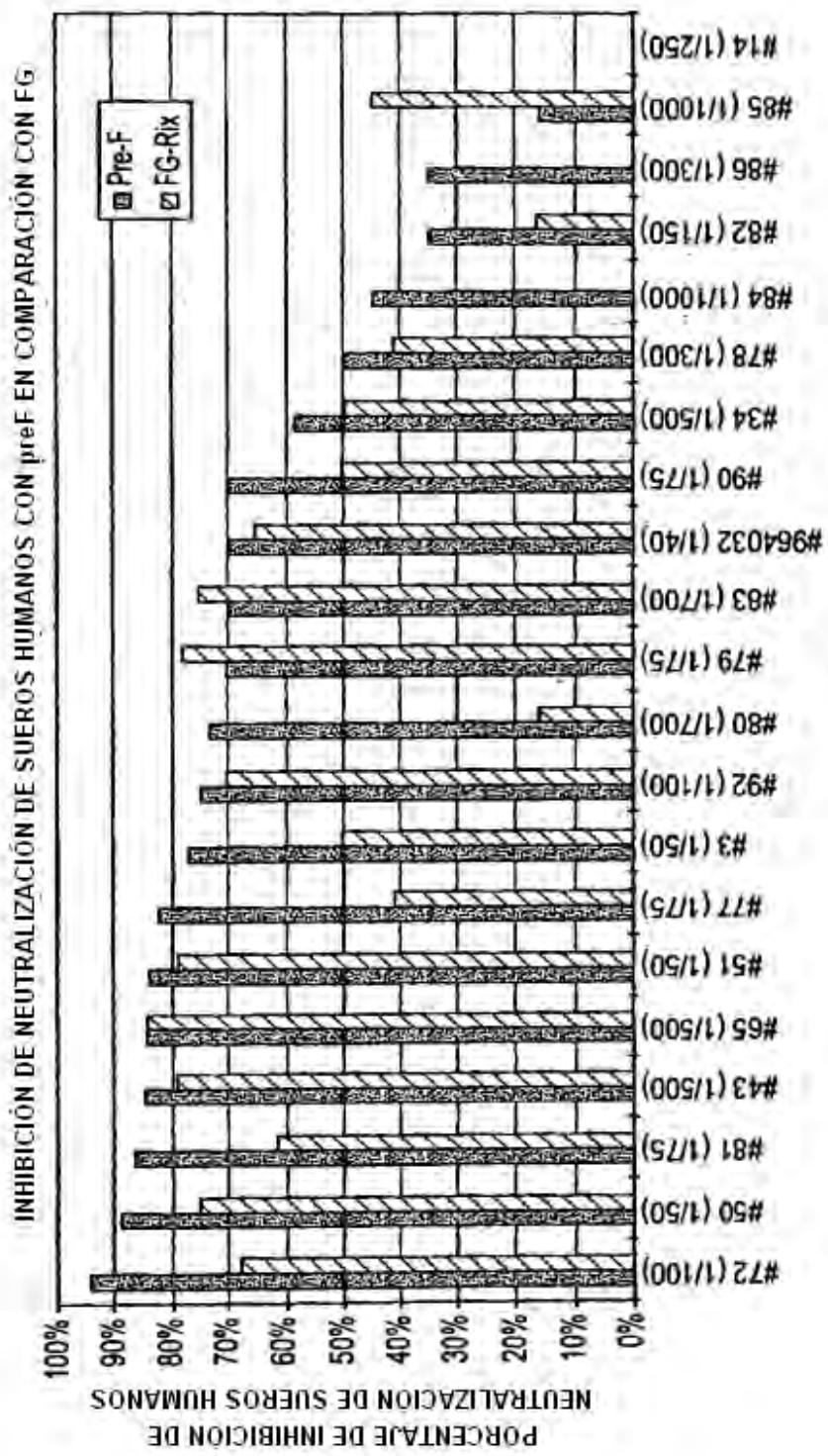


FIG. 4A
Serología en ratones inmunizados, CHO-PreF

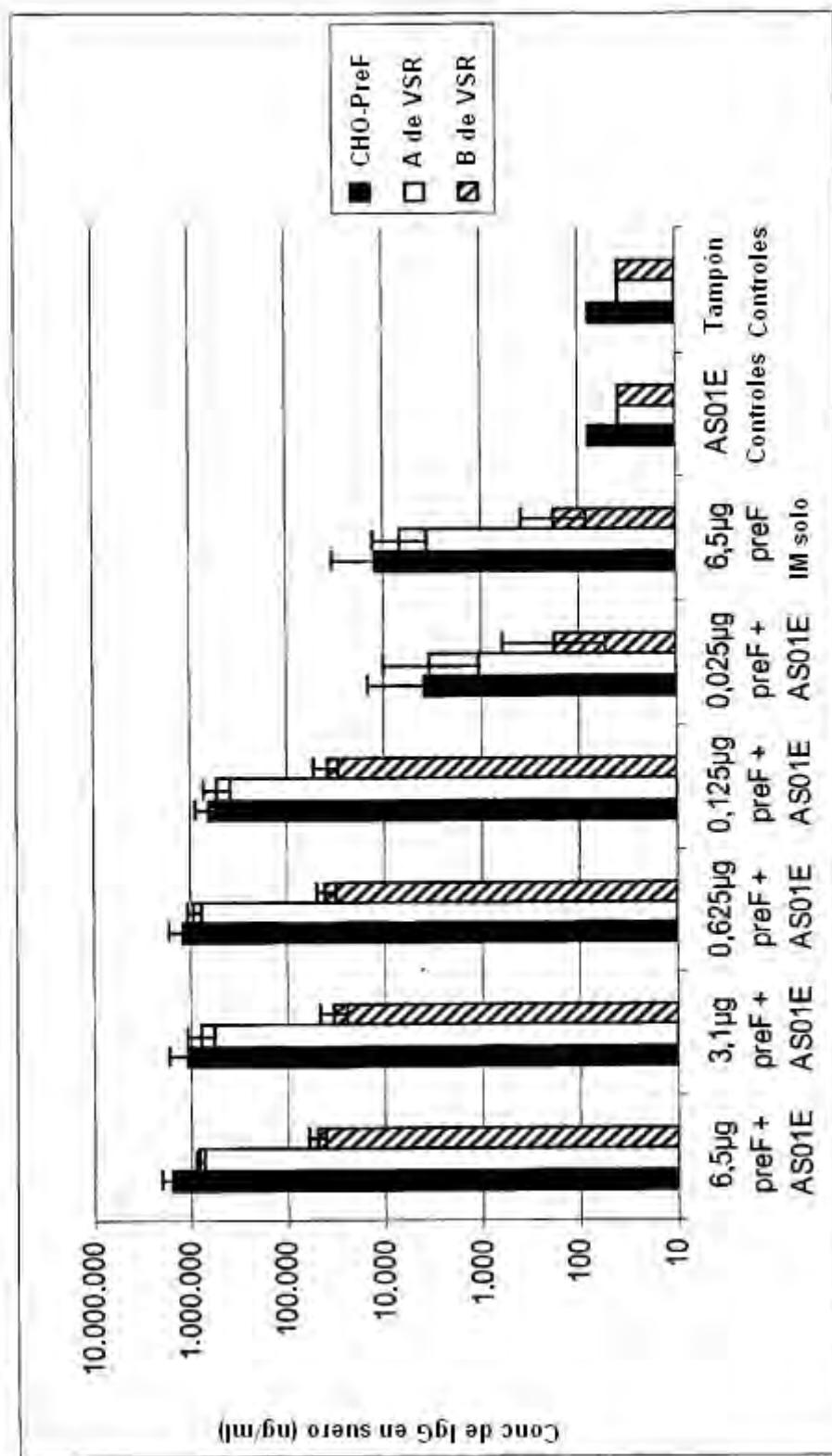


FIG. 4B
Serología en ratones inmunizados, CHO-Pref

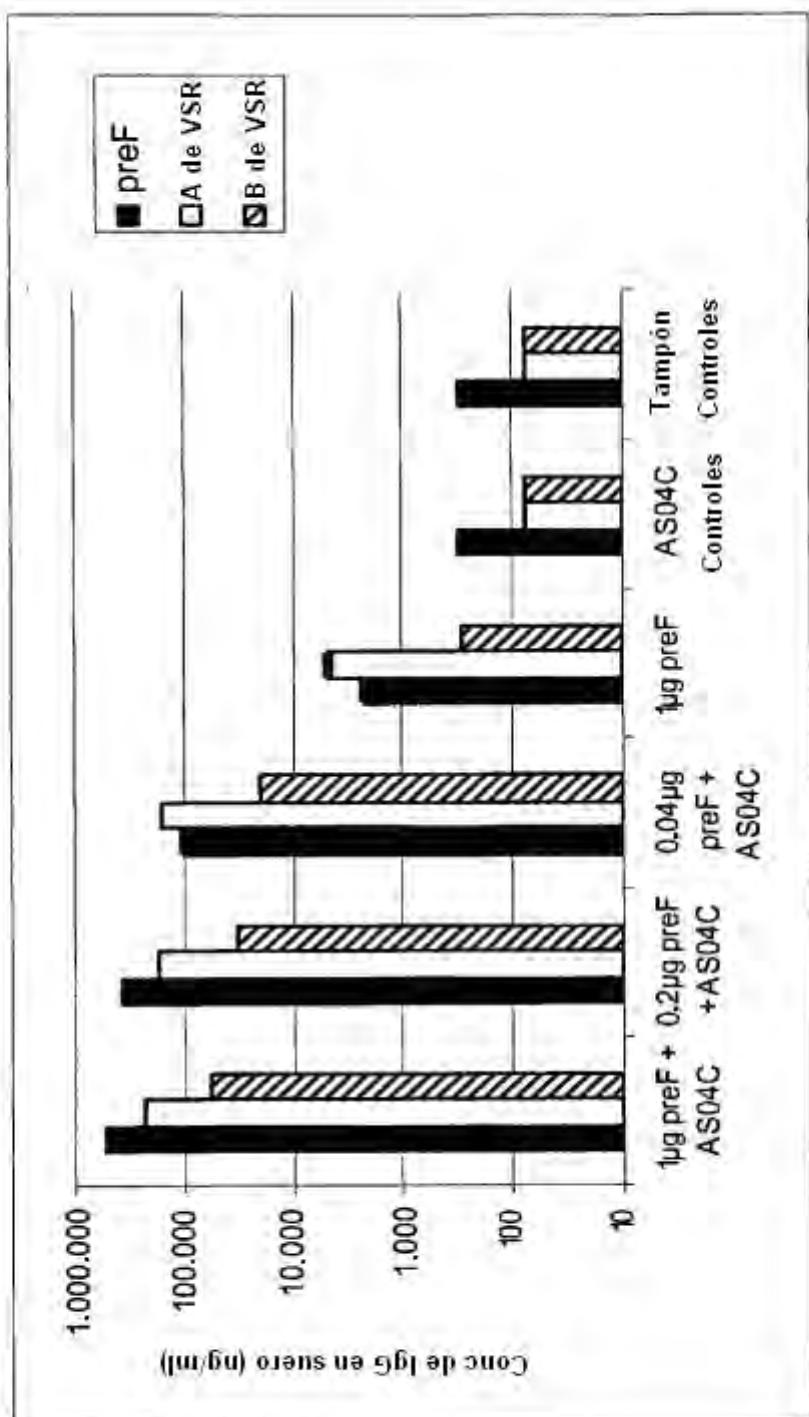
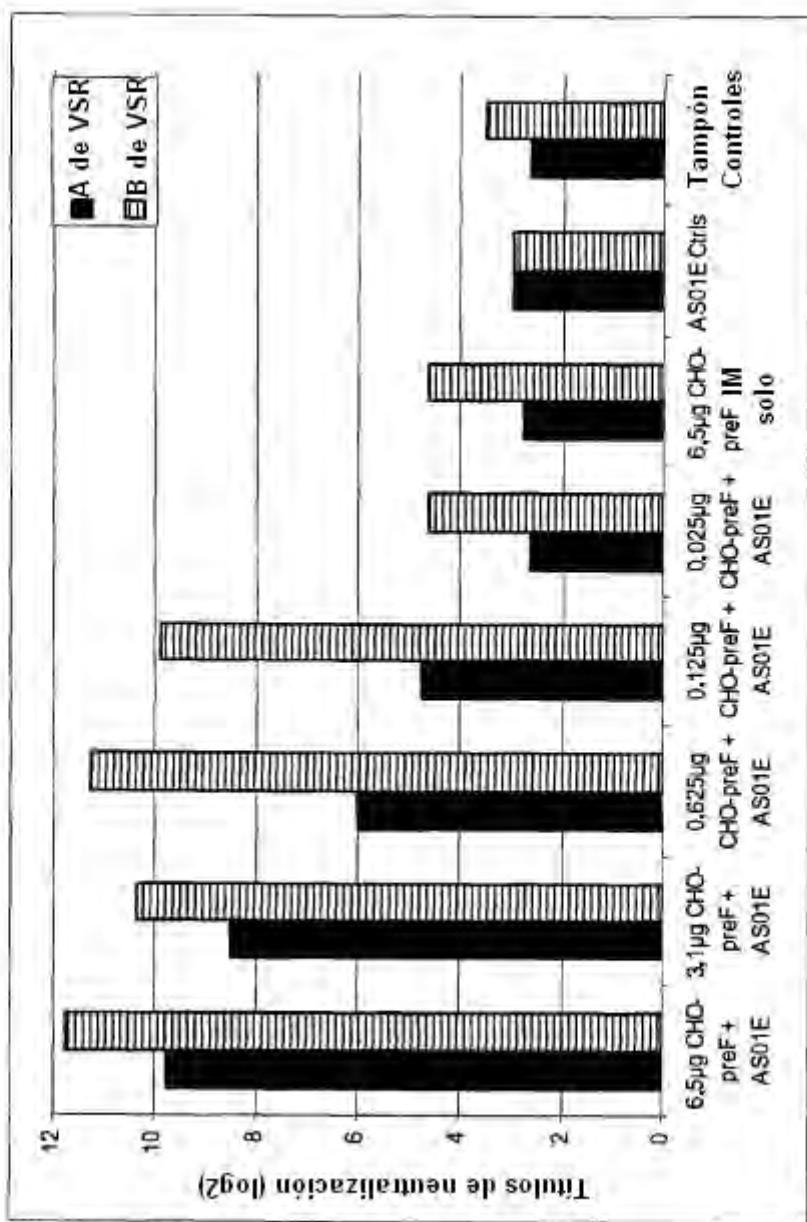


FIG. 5A

Evaluación de CHO-PrefF in vivo
Títulos de neutralización



* Mismo ensayo, sueros tomados de diferentes estudios en animales.

FIG. 5B

Evaluación de CHO-PreF in vivo
Títulos de neutralización

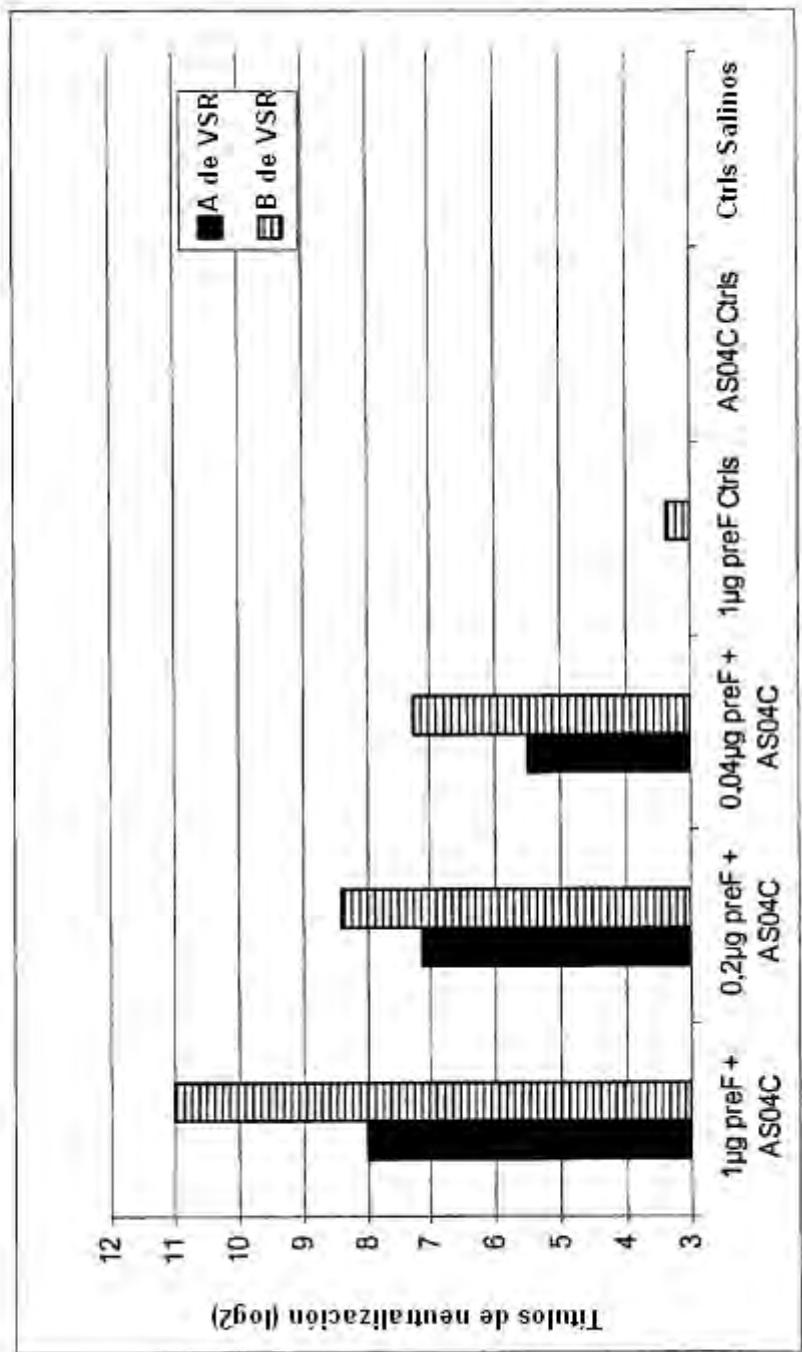


FIG. 6A

Protección de CHO-PrefF frente a estimulación

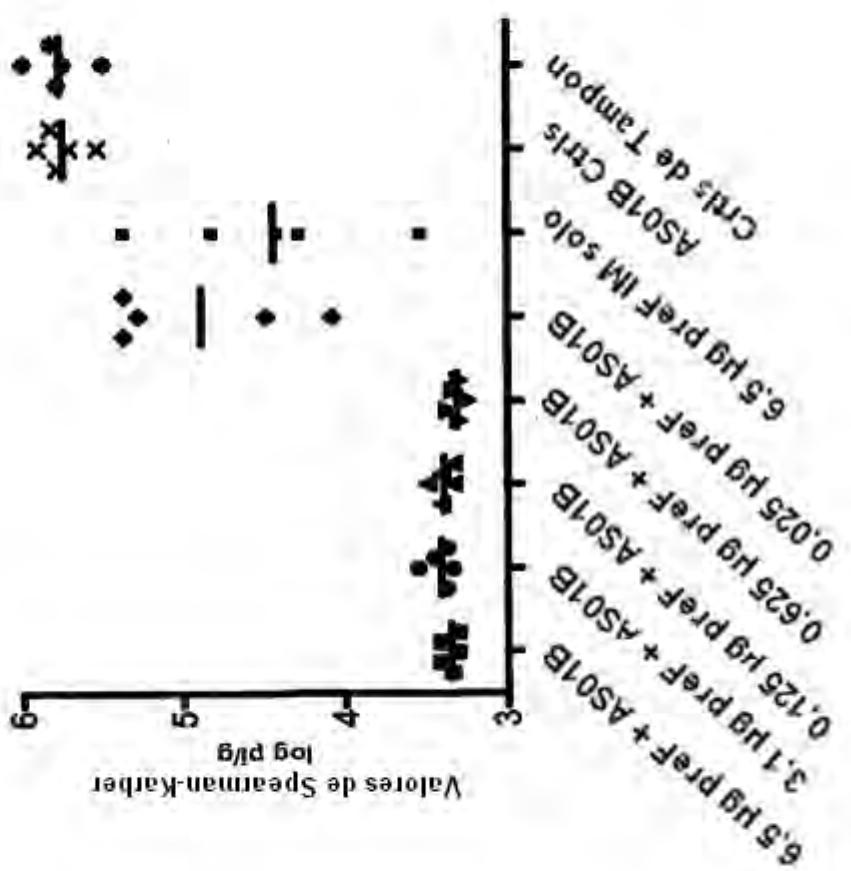


FIG. 6B

Protección de CHO-Pref frente a estimulación

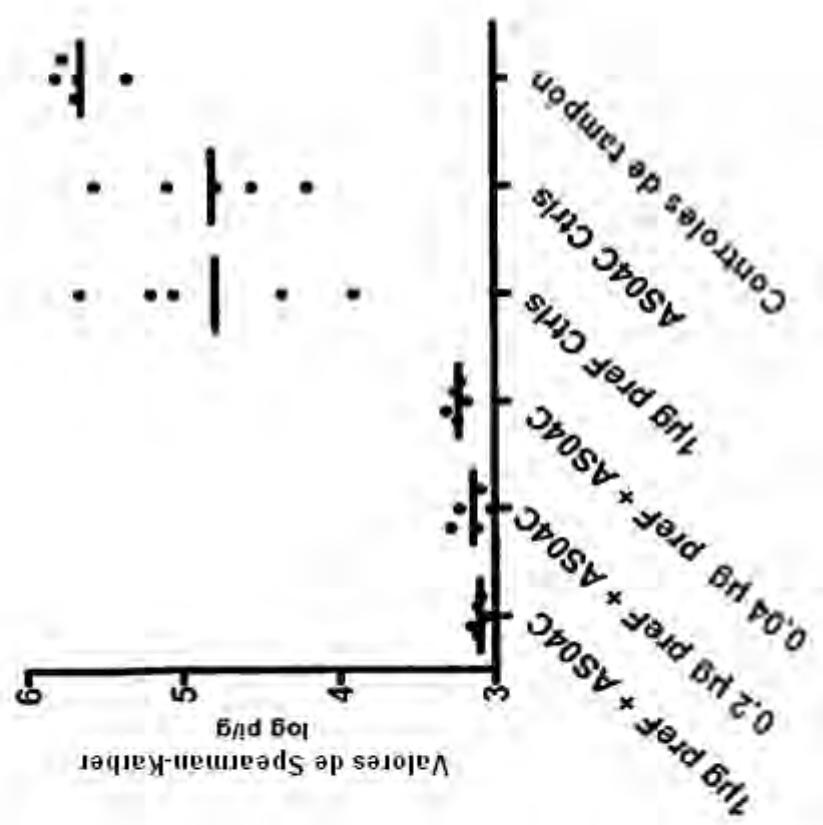


FIG. 7

Reclutamiento de eosinófilos pulmonares después de estimulación en ratones

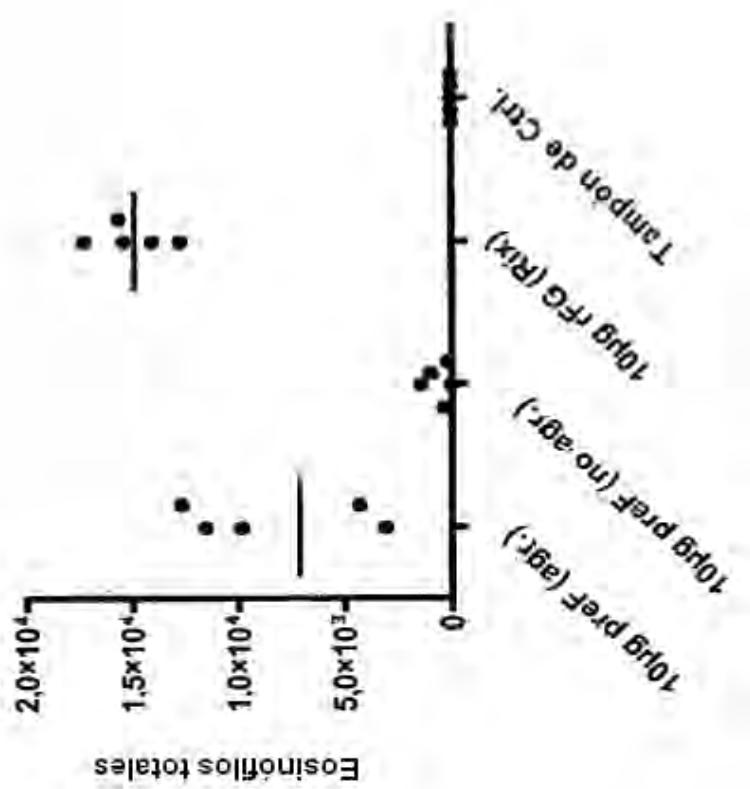


FIG. 8

Niveles de IgG en suero en ratones inmunizados con PreF formulado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua

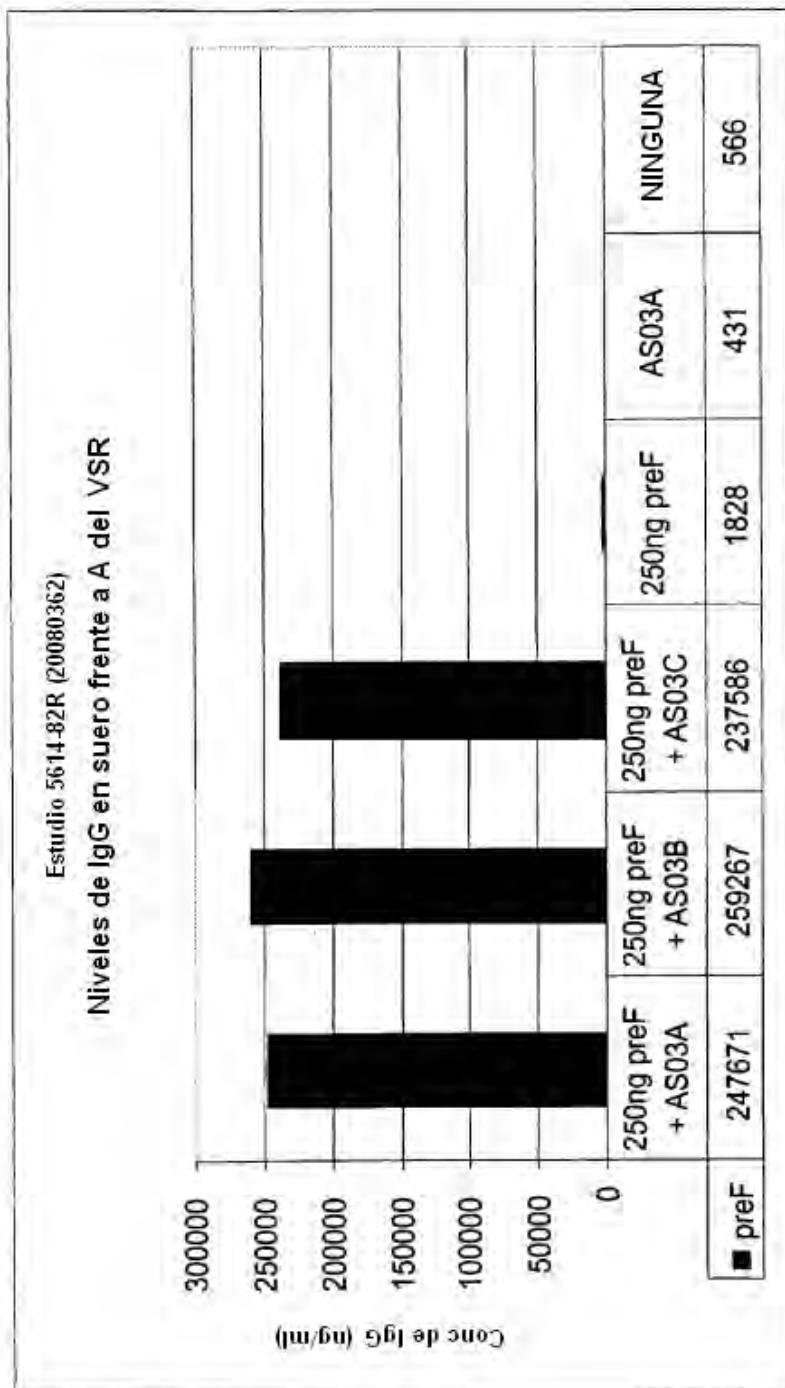
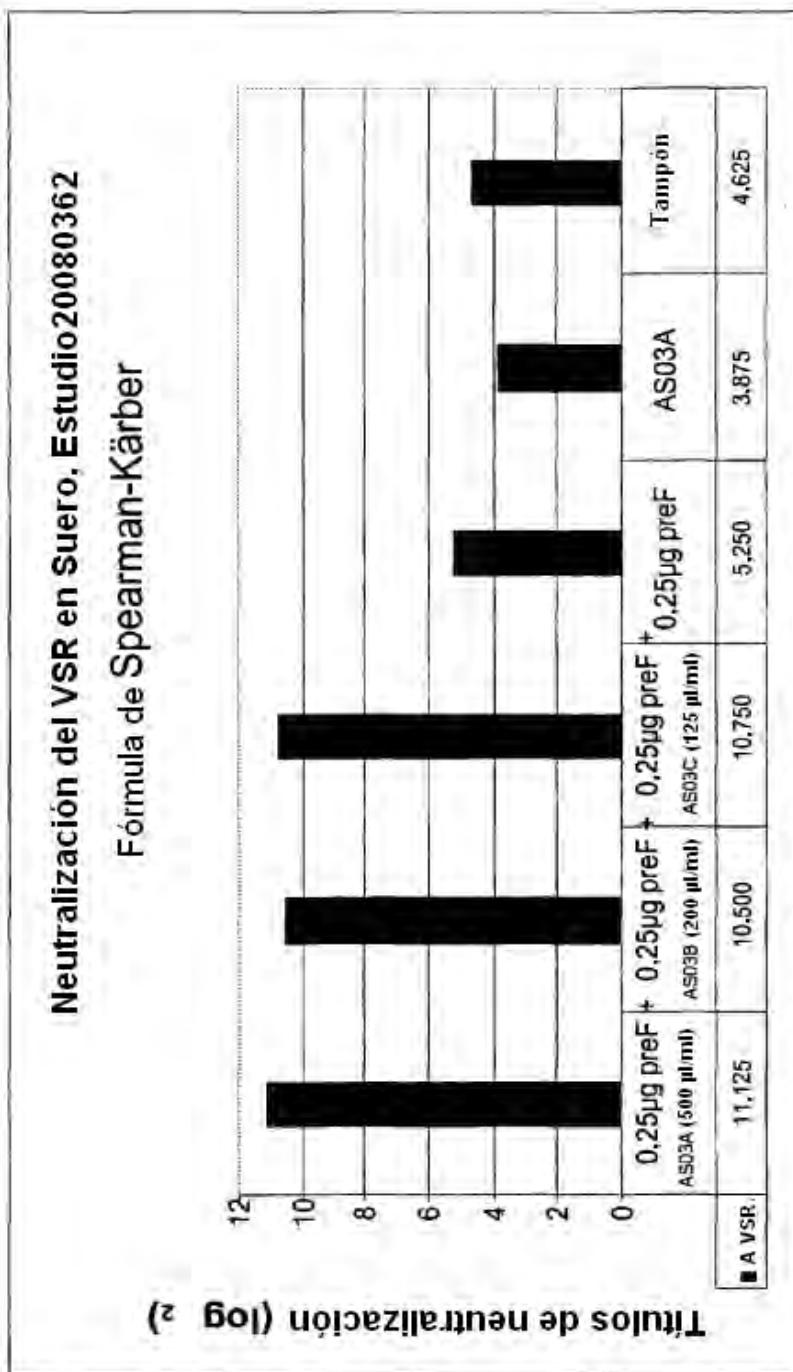
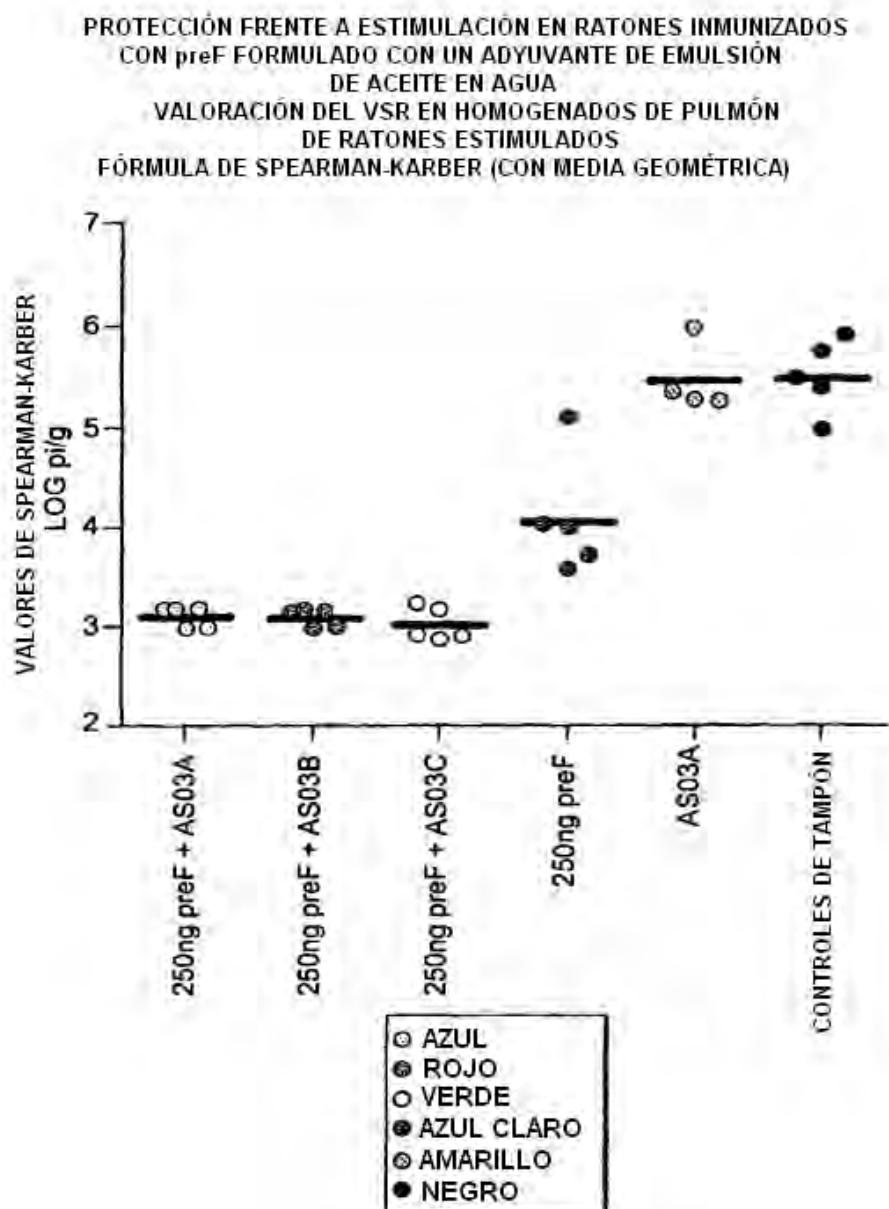


FIG. 9

Títulos de anticuerpo de neutralización en ratones inmunizados con Pref formulado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua



**FIG. 10**