

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 844**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)

C07K 14/135 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010** **E 22200670 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 4183412**

54 Título: **Composiciones de proteína F de VRS y métodos para producir las mismas**

30 Prioridad:

15.07.2009 US 22580509 P

12.01.2010 US 29442610 P

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

05.12.2024

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)

Rue de l'Institut, 89

1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

SWANSON, KURT y
DORMITZER, PHILIP, R.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 991 844 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

Composiciones de proteína F de VRS y métodos para producir las mismas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus respiratorio sincitial (VRS) es un virus de ARN de cadena negativa no segmentado con envoltura de la familia *Paramyxoviridae*, género *Pneumovirus*. Es la causa más común de bronquiolitis y neumonía entre los niños en su primer año de vida. El VRS también provoca infecciones repetidas incluyendo enfermedad grave de las vías respiratorias inferiores, lo que puede producirse a cualquier edad, especialmente entre los ancianos o aquellos con sistemas cardíaco, pulmonar o inmunitario comprometidos.

Para infectar una célula huésped, los paramixovirus tales como VRS, como otros virus con envoltura tales como virus influenza y VIH, requieren la fusión de la membrana viral con la membrana de una célula huésped. Para VRS, la proteína de fusión conservada (F de VRS) fusiona las membranas viral y celular acoplado el repliegamiento irreversible de las proteínas con la yuxtaposición de las membranas. En modelos actuales basados en estudios con paramixovirus, la proteína F de VRS se pliega inicialmente en una conformación de "prefusión" metaestable. Durante la entrada en la célula, la conformación de prefusión experimenta repliegamiento y cambios conformacionales a su conformación de "posfusión" estable.

La proteína F de VRS se traduce a partir de ARNm a una proteína de aproximadamente 574 aminoácidos designada F₀. El procesamiento postraduccional de F₀ incluye la eliminación de un péptido señal N-terminal por una peptidasa señal en el retículo endoplasmático. F₀ también se escinde en dos sitios (aproximadamente 109/110 y aproximadamente 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi. Esta escisión da como resultado la eliminación de una secuencia intermedia corta y genera dos subunidades designadas F₁ (~50 kDa; C-terminal; aproximadamente los residuos 137-574) y F₂ (~20 kDa; N-terminal; aproximadamente los residuos 1-109) que permanecen asociadas entre sí. F₁ contiene un péptido de fusión hidrófobo en su extremo N-terminal y también dos regiones de repetición de héptada anfipática (HRA y HRB). HRA está cerca del péptido de fusión y HRB está cerca del dominio transmembrana. Se ensamblan tres heterodímeros F₁-F₂ como homotrímeros de F₁-F₂ en el virión.

Actualmente, no está disponible una vacuna contra la infección por VRS, pero se desea. Un posible enfoque para producir una vacuna es una vacuna de subunidades basada en proteína F de VRS purificada. En el documento WO2009/079796A se da a conocer un antígeno F de VRS recombinante que comprende un ectodominio fusionado a un dominio de multimerización de proteína GCN4. Sin embargo, para este enfoque, es deseable que la proteína F de VRS purificada esté en una sola forma y conformación que sea estable a lo largo del tiempo, constante entre los lotes de vacunas, y convenientemente purificada.

La proteína F de VRS puede truncarse, por ejemplo por delección del dominio transmembrana y la cola citoplasmática, para permitir su expresión como ectodominio, que puede ser soluble. Además, aunque la proteína F de VRS se traduce inicialmente como un monómero, los monómeros se escinden y se ensamblan en trímeros. Cuando la proteína F de VRS está en forma de trímeros escindidos, se expone el péptido de fusión hidrófobo. Los péptidos de fusión hidrófobos expuestos en diferentes trímeros, por ejemplo, trímeros de ectodominios solubles, pueden asociarse entre sí, dando como resultado la formación de rosetas. Los péptidos de fusión hidrófobos pueden asociarse también con lípidos y lipoproteínas, por ejemplo a partir de células que se usan para expresar proteína F de VRS soluble recombinante. Debido a la complejidad del procesamiento, la estructura y el repliegamiento de la proteína F de VRS, es difícil obtener preparaciones inmunogénicas purificadas y homogéneas.

Por tanto, existe la necesidad de composiciones de proteína F de VRS mejoradas y métodos para preparar composiciones de proteína F de VRS.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una proteína F de VRS recombinante soluble, en forma de trímero, que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde

(i) el primer dominio comprende el ectodominio F de VRS en su totalidad o en parte y

(ii) el segundo dominio comprende un dominio de oligomerización heterólogo que es la secuencia trimerizante de la fibrina del bacteriófago T4 ("foldon"); en donde el ectodominio F de VRS en su totalidad o en parte comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 23-525 de SEQ ID NO: 2; y

en el que la composición inmunogénica es para uso como medicamento. En una realización, la composición inmunogénica de la invención es para su uso en la inmunización de un paciente contra infección por VRS.

Según la invención, la proteína F de VRS es soluble. La proteína F de VRS tiene la región transmembrana y la cola citoplasmática delecionadas. La proteína F de VRS es un trímero, o una combinación de monómeros y trímeros. El trímero puede estar monodisperso o en forma de una roseta. En otros aspectos adicionales o alternativos, la proteína F de VRS puede estar en una conformación de prefusión, una conformación intermedia o una conformación de posfusión.

En otro aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido F de VRS en el que F de VRS contiene los aminoácidos 23-99 y 151-524 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En realizaciones preferidas, la composición inmunogénica incluirá un adyuvante. El adyuvante es preferiblemente una sal de aluminio, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59), un compuesto de benzonaftiridina, un compuesto de fosfolípido (tal como E6020), un inmunopotenciador de molécula pequeña o una combinación de dos cualesquiera o más de cualquiera de los anteriores.

El F de VRS está en forma de un trímero o roseta de trímeros. El polipéptido recombinante puede incluir un péptido señal.

Los polipéptidos de ectodominio de F de VRS pueden estar en una sola forma, tal como trímeros no escindidos, trímeros escindidos o rosetas de trímeros escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la presencia de una sola forma deseada de F de VRS en una composición inmunogénica proporciona una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto, y una estabilidad más constante y otras características físicas y químicas cuando se formula en una vacuna.

Cualquier referencia a un método de tratamiento puesto en práctica sobre el cuerpo humano o animal ha de interpretarse como las proteínas de la invención y las composiciones que comprenden los mismos para su uso en tales métodos de tratamiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el esquema de la F de VRS de tipo natural (figura 1A) y de un constructo de ectodominio en el que el dominio transmembrana y la cola citoplasmática se han eliminado y se ha añadido una etiqueta HIS6 opcional al extremo C-terminal (figura 1B). Por claridad, la numeración de residuos se refiere a la F de VRS de la cepa A2 de tipo natural que comienza en el péptido señal N-terminal y no está alterada en constructos que contienen delecciones de aminoácidos. En los esquemas está marcada la secuencia señal o péptido señal (sp). La figura 1A es un esquema de la proteína F de VRS que muestra la secuencia señal o péptido señal (SP), la región ligadora p27, el péptido de fusión (FP), el dominio HRA (HRA), el dominio HRB (HRB), la región transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CT). Los límites C-terminales del ectodominio pueden variar. La figura 1B es un esquema general del constructo de ectodominio de F de VRS que representa las características compartidas con los esquemas de la figura 1A y que incluye una etiqueta HIS6 opcional (ETIQUETA HIS). Están presentes sitios de escisión de furina en las posiciones de aminoácido 109/110 y 136/137. La figura 1C también muestra la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 100 - 150 de F de VRS (tipo natural) (SEQ ID NO: 108) y varias proteínas (Furmt-SEQ ID NO: 3; Furdel-SEQ ID NO: 4; Furx-SEQ ID NO: 6; Furx R113Q, K123N, K124N-SEQ ID NO: 5; Furx R113Q, K123Q, K124Q-SEQ ID NO: 92; Delp21 furx-SEQ ID NO: 7; Delp23 furx-SEQ ID NO: 8; Delp23 furdel-SEQ ID NO: 9; Furina N-term-SEQ ID NO: 10; Furina C-term-SEQ ID NO: 11; Delección de péptido de fusión 1-SEQ ID NO: 12; y Factor Xa-SEQ ID NO: 13) en las que uno o ambos sitios de escisión de furina y/o región de péptido de fusión están mutados o delecionados. En la figura 1C, el símbolo "-" indica que el aminoácido en esa posición está delecionado.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal desde la posición de aminoácido 488 hasta el inicio de la región TM de F de VRS (tipo natural) (SEQ ID NO: 94) y varias proteínas (SEQ ID NOS: 95-100) que contienen sitios de escisión de proteasa añadidos. En la figura 2, el símbolo "-" indica que no hay aminoácido en esa posición.

La figura 3 es un cromatograma y una imagen de un gel de electroforesis que muestra la purificación de monómeros de F de VRS F (3) usando cromatografía de exclusión molecular.

Las figuras 4A-4F muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 101) del plásmido que codifica la molécula de ARN autorreplicante pT7-TC83R-FL.RSVF (A317) que codifica la glucoproteína F del virus respiratorio sincitial (F de VRS). La secuencia de nucleótidos que codifica F de VRS está subrayada.

La figura 5 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de proteínas F de varias cepas de VRS. La alineación se preparó usando el algoritmo dado a conocer por Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22):10881-10890, usando parámetros por defecto (tabla de comparación de símbolos Blossum 62, penalización por apertura de hueco: 12, penalización por extensión de hueco: A2, proteína F de la cepa A2 (número de registro AF035006) (SEQ ID NO: 102); CP52, proteína F de la cepa CP52 (número de registro AF013255) (SEQ ID NO: 103); B, proteína F de la cepa B (número de registro AF013254) (SEQ ID NO: 104); Long, proteína F de la cepa Long (número de registro AY911262) (SEQ ID NO: 105) y cepa 18537, proteína F de la cepa 18537 (número de registro Swiss Prot P13843) (SEQ ID NO: 106).

106). También se muestra un consenso de secuencias de proteína F (SEQ ID NO: 107).

La figura 6 muestra regiones relevantes de cromatogramas de exclusión molecular (SEC) de purificaciones de antígenos F de VRS seleccionados. El pico principal que contiene el antígeno indicado se indica mediante un asterisco con el tiempo de retención de la columna Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) indicado en mililitros. En una columna calibrada, los tiempos de retención aproximados de 47 ml, 65 ml y 77 ml corresponden al volumen vacío de la columna, la retención del trímero de F de VRS y la retención del monómero de F de VRS, respectivamente. En la figura 6A, el constructo Delp23 Furdel (Δ p23 Furdel) no escindido se purifica del pico de monómero a aproximadamente 77 ml. Cuando el antígeno F de VRS Delp23 Furdel no escindido se trata con tripsina, la proteína puede formar rosetas, que migran ahora sobre la SEC en el volumen vacío a aproximadamente 47 ml (figura 6B). La especie de trímero escindido de la delección de péptido de fusión de F de VRS se purifica del pico de trímero a un tiempo de retención de aproximadamente 65 ml (figura 6C) mientras que el constructo Delp21 Furx (Δ p21 Furx) no escindido se purifica del pico de monómero a aproximadamente 77 ml (figura 6D).

La figura 7 muestra imágenes de EM representativas de antígenos F de VRS seleccionados. La figura 7A muestra una imagen de EM de F de VRS Δ p23 (Delp23) antes del tratamiento con tripsina. Las formas de muleta de la figura 7A, consecuentes con una conformación de trímero de posfusión, no siempre se observan en el constructo Δ p23 (Delp23) Furdel no escindido. Cuando el constructo Δ p23 (Delp23) Furdel se trata con tripsina y se purifica del volumen vacío de una columna de SEC y se observa mediante EM, se encuentra que las proteínas han adoptado conformaciones de roseta (figura 7B). Cuando el constructo de delección de péptido de fusión de F de VRS se purifica del pico de trímero sobre una columna de SEC, se observa una forma de muleta monodispersa, consecuente con un trímero de posfusión (figura 7C). En la figura 7D se muestran tres preparaciones de cualquiera de F de VRS Δ p21 (Delp21) furx (marcado como monómero), F de VRS de delección de péptido de fusión (carriles marcados como trímero) y rosetas de F de VRS purificadas (marcadas como rosetas). El gel contiene varios carriles de GE Full Range Standard (los pesos moleculares convencionales están marcados a la izquierda del gel) mientras que los tiempos de retención aproximados de los fragmentos de F de VRS están indicados a la derecha del gel.

Las figuras 8A-8C son gráficos que muestran que los monómeros (Δ p21 (Delp21) furx no escindido), las rosetas de trímeros (Δ p23 (Delp23) Furdel escindido) y los trímeros (delección de péptido de fusión) de polipéptidos de ectodominio de F de VRS son inmunogénicos en ratas algodoneras. Se midieron los títulos en suero de IgG anti-F de VRS y anticuerpos neutralizantes anti-VRS 2 semanas después de la 1ª vacunación (2wp1), 3 semanas después de la 1ª vacunación (3wp1) y/o 2 semanas después de la 2ª vacunación (2wp2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere al uso de composiciones inmunogénicas que comprenden proteínas F de VRS, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En general, las composiciones inmunogénicas comprenden polipéptidos y/o proteínas F de VRS que contienen mutaciones (por ejemplo, reemplazos, delecciones o adiciones de aminoácidos) que proporcionan características beneficiosas, tales como una o más de 1) conformación de prefusión o intermedia (no de posfusión) estabilizada, 2) exposición reducida o eliminada del péptido de fusión, 3) estabilidad mejorada (por ejemplo, agregación y/o degradación reducida y 4) semejanza más estrecha a la proteína viral F1/F2 activa. Estas características proporcionan ventajas para las composiciones inmunogénicas y para la fabricación de las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, las conformaciones que no son de posfusión de la proteína F de VRS (es decir, conformación de prefusión, conformaciones intermedias) pueden ser mejores inmunógenos y provocar una mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes. La reducción o eliminación de la exposición del péptido de fusión, por ejemplo, introduciendo mutaciones o delecciones en los sitios de escisión de furina, reducirá la hidrofobicidad del polipéptido y facilitará las purificaciones, y también reducirá o eliminará la asociación de la proteína F de VRS con las membranas celulares en un sujeto al que se administra la proteína. La estabilidad mejorada de la proteína facilita la producción de composiciones inmunogénicas en las que la proteína tiene una tendencia disminuida a agregarse o degradarse, lo que proporciona una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto. Finalmente, polipéptidos o proteínas F de VRS mutantes que se asemejan a la proteína viral F1/F2, por ejemplo mediante la delección de la totalidad o parte de la región ligadora p27, pueden provocar una mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes. Otras ventajas de la invención se describen en el presente documento.

Preferiblemente, los polipéptidos de ectodominio de F de VRS están en una sola forma o en un equilibrio dinámico entre formas conocidas.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "población" se refiere a más de un polipéptido o proteína F de VRS que está presente en una composición. La población puede ser sustancialmente homogénea, en la que sustancialmente todos los polipéptidos o proteínas F de VRS son sustancialmente iguales (por ejemplo, misma secuencia de aminoácidos, misma conformación), heterogénea o tener un grado deseado de homogeneidad (por ejemplo, al menos

aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % de los polipéptidos o proteínas F de VRS están en la conformación de prefusión, están en la conformación de posfusión, son monómeros, son trímeros).

La "conformación de posfusión" de la proteína F de VRS es un trímero caracterizado por la presencia de un haz de seis hélices que comprende 3 regiones HRB y 3 HRA.

La "conformación de prefusión" de la proteína F de VRS es una conformación caracterizada por un trímero que contiene una triple hélice que comprende 3 regiones HRB.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de F de VRS" se refiere a un polipéptido de proteína F de VRS que contiene sustancialmente la porción extracelular de la proteína F de VRS madura, con o sin el péptido señal (por ejemplo, de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 524, o de aproximadamente el aminoácido 22 a aproximadamente el aminoácido 524) pero carece del dominio transmembrana y la cola citoplasmática de la proteína F de VRS que se produce de manera natural.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de F de VRS escindido" se refiere a un polipéptido de ectodominio de F de VRS que se ha escindido en una o más posiciones de aproximadamente 101/102 a aproximadamente 160/161 para producir dos subunidades, en el que una de las subunidades comprende F₁ y la otra subunidad comprende F₂.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de F de VRS no escindido C-terminal" se refiere a un polipéptido de ectodominio de F de VRS que se escinde en una o más posiciones de aproximadamente 101/102 a aproximadamente 131/132, y no se escinde en una o más posiciones de aproximadamente 132/133 a aproximadamente 160/161, para producir dos subunidades, en el que una de las subunidades comprende F₁ y la otra subunidad comprende F₂.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido de ectodominio de F de VRS no escindido" se refiere a un polipéptido de ectodominio de F de VRS que no se escinde en una o más posiciones de aproximadamente 101/102 a aproximadamente 160/161. Un polipéptido de ectodominio F de VRS no escindido puede ser, por ejemplo, un monómero o un trímero.

Tal como se usa en el presente documento, "péptido de fusión" se refiere a los aminoácidos 137-154 de la proteína F de VRS.

Tal como se usa en el presente documento, "péptido de fusión alterado" se refiere a un péptido de fusión en el que uno o más aminoácidos se reemplazan o delecionan independientemente, incluyendo el reemplazo o la delección de todos los aminoácidos de las posiciones 137-154. Preferiblemente, los polipéptidos de ectodominio de F de VRS escindidos que contienen un "péptido de fusión alterado" no forman rosetas.

Tal como se usa en el presente documento, una proteína o polipéptido "purificado" es una proteína o polipéptido que se produce de manera recombinante o sintética, o se produce por su huésped natural, y se ha aislado de otros componentes del sistema de producción recombinante o sintético o huésped natural de manera que la cantidad de la proteína en relación con otros componentes macromoleculares presentes en una composición es sustancialmente mayor que la presente en una preparación en bruto. En general, una proteína purificada será al menos aproximadamente el 50 % homogénea y más preferiblemente al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogénea.

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente libre de lípidos y lipoproteínas" se refiere a composiciones, proteínas y polipéptidos que están al menos aproximadamente el 95 % libres de lípidos y lipoproteínas en una base en masa cuando se observa la pureza de la proteína y/o polipéptido (por ejemplo, polipéptido F de VRS) en un gel de SDS PAGE y se mide el contenido de proteína total usando o bien absorción de UV280 o bien análisis de BCA, y se determina el contenido de lípidos y lipoproteínas usando el ensayo de fosfolipasa C (Wako, n.º de código 433-36201).

Tal como se usa en el presente documento, "sitio de escisión de furina alterado" se refiere a la secuencia de aminoácidos en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136 en la proteína F de VRS que se produce de manera natural que se reconocen y se escinden por furina o proteasas similares a la furina, pero en un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido contiene uno o más reemplazos de aminoácidos, una o más delecciones de aminoácidos, o una combinación de uno o más reemplazos de aminoácidos y una o más delecciones de aminoácidos, de modo que se secreta un polipéptido de ectodominio de F de VRS que contiene un sitio de escisión de furina alterado de una célula que lo produce sin escindir en el sitio de escisión de furina alterado.

Las características de los ectodominios de proteína F de VRS adecuados para su uso en esta invención se describen en el presente documento con referencia a aminoácidos particulares que se identifican por la posición del aminoácido en la secuencia de proteína F de VRS de la cepa A2 (SEQ ID NO: 1). Los ectodominios de proteína F de VRS pueden tener la secuencia de aminoácidos de la proteína F de la cepa A2 o cualquier otra cepa deseada. Cuando se usa el ectodominio de proteína F de una cepa distinta de la cepa A2, los aminoácidos de la proteína F han de numerarse con referencia a la numeración de la proteína F de la cepa A2, con la inserción de huecos según sea necesario. Esto puede lograrse alineando la secuencia de cualquier proteína F de VRS deseada con la proteína F de la cepa A2, tal como se muestra en el presente documento para proteínas F de la cepa A2, cepa CP52, cepa B, cepa Long y la cepa 18537. Véase la figura 5. Las alineaciones de secuencias se producen preferiblemente usando el algoritmo dado a conocer por Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22): 10881-10890, usando parámetros por defecto (tabla de comparación de símbolos Blossum 62, penalización por apertura de hueco: 12, penalización por extensión de hueco: 2).

Los polipéptidos F de VRS (por ejemplo, polipéptidos de ectodominio) pueden ser trímeros no escindidos, trímeros escindidos o rosetas de trímeros escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la presencia de una sola forma deseada de VRS, o un equilibrio dinámico entre formas conocidas, en una composición inmunogénica, proporciona una formulación, solubilidad y estabilidad más predecibles, y una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto.

Preferiblemente, los polipéptidos de ectodominio de F de VRS están en una sola forma, tal como trímeros no escindidos, trímeros escindidos o rosetas de trímeros escindidos.

En un aspecto de la invención, los polipéptidos y proteínas F de VRS están en conformación de prefusión. Los epítomos de la conformación de prefusión pueden ser capaces de generar mejor anticuerpos que pueden reconocer y neutralizar viriones naturales.

En una realización de la invención, una composición inmunogénica comprende una población de glucoproteínas F de virus respiratorio sincitial en conformación de prefusión. En otro aspecto de la invención, una composición inmunogénica comprende una población de glucoproteínas F de virus respiratorio sincitial que desfavorecen la conformación de posfusión en comparación con una población de glucoproteínas F de VRS aisladas.

La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que muestra un epítipo presente en una conformación de prefusión o de fusión intermedia de la glucoproteína F de virus respiratorio sincitial pero ausente en la conformación de posfusión de la glucoproteína.

La glucoproteína F

La glucoproteína F de VRS dirige la penetración viral por la fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped. Es una proteína integral de la membrana de un solo paso de tipo I que tiene cuatro dominios generales: secuencia señal (SS) de translocación al ER N-terminal, ectodominio (ED), dominio transmembrana (TM) y una cola citoplasmática (CT). La CT contiene un solo residuo de cisteína palmitoilada. La secuencia de la proteína F está altamente conservada entre los aislados de VRS, pero está en constante evolución (7). A diferencia de la mayoría de los paramixovirus, la proteína F en VRS puede mediar en la entrada y la formación de sincitios independientemente de las otras proteínas virales (habitualmente, es necesaria la HN además de F en otros paramixovirus).

El ARNm de F de VRSh se traduce en una proteína precursora de 574 aminoácidos designada F₀, que contiene una secuencia de péptido señal en el extremo N-terminal que se elimina por una peptidasa señal en el retículo endoplasmático. F₀ se escinde en dos sitios (a.a. 109/110 y 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi, eliminando una secuencia intermedia glucosilada corta y generando dos subunidades designadas F₁ (~50 kDa; extremo C-terminal; residuos 137-574) y F₂ (~20 kDa; extremo N-terminal; residuos 1-109) (véase, por ejemplo, la figura 1). F₁ contiene un péptido de fusión hidrófobo en su extremo N-terminal y también dos regiones de repetición de héptada hidrófobas (HRA y HRB). HRA está cerca del péptido de fusión y HRB está cerca el dominio transmembrana (véase, por ejemplo, la figura 1). Los heterodímeros F₁-F₂ se ensamblan como homotrímeros en el virión.

VRS existe como un solo serotipo pero tiene dos subgrupos antigénicos: A y B. Las glucoproteínas F de los dos grupos son aproximadamente el 90 % idénticas. En la invención puede usarse el subgrupo A, el subgrupo B o una combinación o híbrido de ambos. Una secuencia de ejemplo para el subgrupo A es SEQ ID NO: 1 (cepa A2; GenBank GI: 138251; Swiss Prot P03420), y para el subgrupo B es SEQ ID NO: 2 (cepa 18537; GI: 138250; Swiss Prot P13843). SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 son ambas secuencias de 574 aminoácidos. El péptido señal en la cepa A2 son los a.a. 1-21, pero en la cepa 18537 son 1-22. En ambas secuencias, el dominio TM son aproximadamente los a.a. 530-550, pero se ha notificado alternativamente como 525-548.

SEQ ID NO: 1

1 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE 60
 61 LSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARRELPRFMNYTLN 120
 121 NAKKTNVTLSSKKRKRRLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVS 180
 181 LSNGVSVLTSKVLDDLKNIYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVN 240
 5 241 AGVTPPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
 301 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV 360
 361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT 420
 421 KCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDP 480
 481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLS 540
 10 541 LIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN 574

SEQ ID NO: 2

1 MELLHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE 60
 61 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNYTIN 120
 15 121 TTKNLNVSISKKRKRRLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVS 180
 181 LSNGVSVLTSKVLDDLKNIYINNRLPIVKNQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVN 240
 241 AGVTPPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
 301 VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV 360
 361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT 420
 20 421 KCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPIINYYP 480
 481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVLLS 540
 541 LIAIGLLLYCKAKNTPTVTLSDQLSGINNIAFSK 574

La invención puede usar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o cualquier secuencia de aminoácidos F de VRS deseada que tiene al menos el 80 % de identidad con SEQ ID NO: 1 o 2, por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1 o 2. La secuencia puede encontrarse de manera natural en VRS.

La invención usa un ectodominio de proteína F que, en su totalidad o en parte, comprende:

- 30 (i) un polipéptido que comprende aproximadamente los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1.
- (ii) un polipéptido que comprende aproximadamente los aminoácidos 23-525 de SEQ ID NO: 2.
- 35 (iii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad) con (i) o (ii).
- 40 El ectodominio puede ser una forma F_0 con o sin el péptido señal, o puede comprender dos cadenas peptídicas separadas (por ejemplo, una subunidad F_1 y una subunidad F_2) que están asociadas entre sí, por ejemplo, las subunidades pueden estar unidas por un puente disulfuro. Por consiguiente, la totalidad o una porción de aproximadamente el aminoácido 101 a aproximadamente 161, tal como los aminoácidos 110-136, pueden estar ausentes del ectodominio. Por tanto, el ectodominio, en su totalidad o en parte, puede comprender:
- 45 (iv) una primera cadena peptídica y una segunda cadena peptídica que está asociada con la primera cadena polipeptídica, donde la primera cadena peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 % de identidad (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad) con de aproximadamente el aminoácido 22 a aproximadamente el aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 o con de aproximadamente el aminoácido 23 a aproximadamente el aminoácido 101 de SEQ ID NO: 2, y la segunda cadena peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
- 50 el 80 % de identidad (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad) con de aproximadamente el aminoácido 162 a aproximadamente 525 de SEQ ID NO: 1 o con de aproximadamente el aminoácido 162 a 525 de SEQ ID NO: 2.

(vii) Una molécula obtenible por digestión con furina de (i), (ii) o (iii).

Por tanto, una secuencia de aminoácidos usada con la invención puede encontrarse de manera natural dentro de la proteína F de VRS (por ejemplo, una proteína F de VRS soluble que carece de TM y CT, aproximadamente los aminoácidos 522-574 de SEQ ID NOS: 1 o 2), y/o puede tener una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones de aminoácidos individuales (inserciones, deleciones o sustituciones) en relación con una secuencia de VRS natural. Por ejemplo, se sabe cómo mutar proteínas F para eliminar sus secuencias de escisión de furina, impidiendo de ese modo el procesamiento intracelular. En determinadas realizaciones, la proteína F de VRS carece de TM y CT (aproximadamente los aminoácidos 522-574 de SEQ ID NOS: 1 o 2) y contiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones de aminoácidos individuales (inserciones, deleciones o sustituciones) en relación con una secuencia de VRS natural.

Mutaciones de escisión de furina, de escisión de tripsina y de péptido de fusión

Los polipéptidos o proteínas F de VRS pueden contener una o más mutaciones que impiden la escisión en uno o ambos de los sitios de escisión de furina (es decir, aminoácidos 109 y 136 de SEQ ID NOS: 1 y 2). Estas mutaciones pueden impedir la agregación de los polipéptidos o proteínas solubles y, de ese modo, facilitar las purificaciones, pueden impedir la fusión célula-célula si la proteína F de VRS se expresa en la superficie de una célula, tal como por expresión de un replicón viral (por ejemplo, partículas de replicón de alfavirus), o si la proteína F de VRS es un componente de una partícula similar a un virus. Estas mutaciones, solas o en combinación con otras mutaciones descritas en el presente documento, pueden estabilizar también la proteína en la conformación de prefusión.

Los ejemplos de mutaciones de escisión de furina adecuadas incluyen el reemplazo de los residuos de aminoácido 106 - 109 de SEQ ID NO: 1 o 2 con RARK (SEQ ID NO: 77), RARQ (SEQ ID NO: 78), QAQN (SEQ ID NO: 79) o IEGR (SEQ ID NO: 80). Alternativamente, o además, los residuos de aminoácido 133 - 136 de SEQ ID NO: 1 o 2 pueden reemplazarse con RKKK (SEQ ID NO: 81), $\Delta\Delta\Delta$ R, QNQN (SEQ ID NO: 82), QQQR (SEQ ID NO: 83) o IEGR (SEQ ID NO: 80). (Δ indica que el residuo de aminoácido se ha delecionado). Estas mutaciones pueden combinarse, si se desea, con otras mutaciones descritas en el presente documento, tales como mutaciones en la región p27 (aminoácidos 110-136 de SEQ ID NOS: 1 o 2), incluyendo la delección de la región p27 en su totalidad o en parte.

Estas mutaciones de escisión de furina pueden combinarse, si se desea, con otras mutaciones descritas en el presente documento, tales como mutaciones de escisión de tripsina y mutaciones de péptido de fusión. Los ejemplos de mutaciones de escisión de tripsina adecuadas incluyen la delección de cualquier residuo de lisina o arginina entre aproximadamente la posición 101 y la posición 161 de SEQ ID NO: 1 o 2, o el reemplazo de cualquiera de tales residuos de lisina o arginina con un aminoácido distinto de lisina o arginina. Por ejemplo, los residuos de lisina y/o arginina en la región p27 (aproximadamente los aminoácidos 110-136 de SEQ ID NOS: 1 o 2) pueden sustituirse o deleccionarse, incluyendo la delección de la región p27 en su totalidad o en parte.

Alternativamente o además de las mutaciones de escisión de furina, los polipéptidos o proteínas F de VRS pueden contener una o más mutaciones en la región de péptido de fusión (aminoácidos 137 y 153 de SEQ ID NOS: 1 o 2). Por ejemplo, esta región puede deleccionarse en su totalidad o en parte.

En realizaciones particulares, la secuencia de residuo de aminoácido 100 - 150 del polipéptido o proteína F de VRS, tal como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o los ectodominios solubles del mismo, es

(Furmt) TPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKKKFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 3)

(Furdel)TPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKK---RFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 4)

(Furx) TPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 6)

(Furx R113Q, K123N, K124N) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQNTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 5)

(Furx R113Q, K123Q, K124Q)) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQNTNTLSQNNQNFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 92)

(Delp21Furx) TPATNNQAQN-----QNNQNFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 7)

(Delp23Furx) TPATNNQAQN-----QNNQNFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 8)

(Delp21 furdel)TPATNNRARQ-----QNNQQRFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 109)

(Delp23furdel)TPATNNRARQ-----QQQRFLGFLGVSIAIS (SEQ ID NO: 9)

(Furina Nterm) TPATNNRARREL PQFMNYTLNNAQQTNTVLSQNQNQNFLGFLGVSIAIAS (SEQ ID NO: 10)

(Furina Cterm)TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTVLSKKRKRRFLGFLGVSIAIAS (SEQ ID NO: 11)

(Delección de péptido de fusión 1) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRR—SAIAS (SEQ ID NO: 12),

(Delección de péptido de fusión 2) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRR—GVGSAIAS (SEQ ID NO: 91), o

(Factor Xa) TPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKIEGRFLGFLGVSIAIAS (SEQ ID NO: 13); en las que el símbolo “-” indica que el aminoácido en esa posición está deletado.

La proteína F de VRS recombinante para su uso en la invención comprende la secuencia trimerizante de la fibrina del bacteriófago T4 (“foldon”).

En realizaciones particulares, la secuencia del extremo carboxilo terminal del polipéptido o proteína F de VRS, comenzando desde la posición 480, es

(foldon corto)
PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 17); o

(foldon largo)
PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNKNDDKSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO:18)

Además de la secuencia de trimerización de la fibrina del bacteriófago T4 (“foldon”) y cualquier combinación de mutaciones de escisión de furina y mutaciones de péptidos de fusión, polipéptidos o proteínas F de VRS que contienen una región transmembrana que contienen una región transmembrana pueden contener una secuencia de aminoácidos añadida que proporciona un sitio de escisión de proteasa. Este tipo de polipéptido o proteína F de VRS puede producirse mediante expresión en la superficie de una célula, y recuperarse en forma soluble tras la escisión de la superficie celular usando una proteasa apropiada. Generalmente, la secuencia de aminoácidos que proporciona un sitio de escisión de proteasa estará ubicada dentro de aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, o sustancialmente adyacente al extremo amino terminal del dominio transmembrana (aminoácido 525 de SEQ ID NO: 1 o 2). En la técnica se conocen bien muchas secuencias de aminoácidos adecuadas que se escinden por proteasas comercialmente disponibles. Por ejemplo, la trombina escinde la secuencia LVPR (SEQ ID NO: 75), el factor Xa escinde la secuencia IEGR y la enterocinasa escinde la secuencia DDDDK (SEQ ID NO: 76). Estas secuencias de aminoácidos pueden introducirse en un polipéptido F de VRS.

Los polipéptidos inmunogénicos usados según la invención estarán habitualmente aislados o purificados. Por tanto, no estarán asociados con moléculas con las que normalmente, si es aplicable, se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína F usada con la invención no estará en forma de un virión de VRS (aunque puede estar en forma de un virión artificial, tal como un virosoma o VLP).

Los polipéptidos se prepararán habitualmente mediante expresión en un sistema huésped recombinante. Generalmente, se producen (por ejemplo, ectodominios de VRS) mediante expresión de constructos recombinantes que codifican los ectodominios en células huésped recombinantes adecuadas, aunque puede usarse cualquier método adecuado. Las células huésped recombinantes adecuadas incluyen, por ejemplo, células de insecto (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*), células de mamífero (por ejemplo, ser humano, primate no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato y roedor (por ejemplo, hámster), células de ave (por ejemplo, pollo, pato y gansos), bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*), células de *Tetrahymena* (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de las mismas. En la técnica se conocen bien muchas células de insecto y células de mamífero adecuadas. Las células de insecto adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células Schneider S2 y células High Five (un aislado clonal derivado de la línea celular original de *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen)). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK293, normalmente transformadas por ADN de adenovirus de tipo 5 fragmentado), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito de ECACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de resus fetal (ATCC CL-160), células de riñón bovino Madin-Darby (“MDBK”), células de riñón canino Madin-Darby (“MDCK”) (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de cría de hámster

(BHK), tales como BHK21-F, células HKCC, y similares. Las células de ave adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, células de pato (por ejemplo, líneas celulares AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en Vaccine 27:4975-4982 (2009) y el documento WO2005/042728), células EB66, y similares.

Los expertos en la técnica conocen sistemas de expresión de células de insecto adecuados, tales como sistemas de baculovirus, y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA. Los expertos en la técnica también conocen sistemas de expresión de células de ave y se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; la patente europea n.º EP 0787180B; la solicitud de patente europea n.º EP03291813.8; los documentos WO 03/043415; y WO 03/076601. De manera similar, en la técnica también se conocen sistemas de expresión de células bacterianas y de mamífero y se describen en, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr *et al.*, eds., 1989) Butterworths, Londres.

Pueden prepararse constructos recombinantes que codifican ectodominios de proteína F de VRS en vectores adecuados usando métodos convencionales. Se conocen bien varios vectores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto o mamífero y son convencionales en la técnica. Los vectores adecuados pueden contener varios componentes, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen marcador seleccionable; uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador) y/o una o más señales de traducción; y una secuencia señal o secuencia líder para dirigirse a la ruta secretora en una célula huésped seleccionada (por ejemplo, de origen de mamífero o de una especie de mamífero o distinta de mamífero heteróloga). Por ejemplo, para la expresión en células de insecto, se usa un vector de expresión de baculovirus adecuado, tal como pFastBac (Invitrogen), para producir partículas de baculovirus recombinantes. Las partículas de baculovirus se amplifican y se usan para infectar células de insecto para que expresen una proteína recombinante. Para la expresión en células de mamífero, se usa un vector que dirigirá la expresión del constructo en la célula huésped de mamífero deseada (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).

Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS pueden purificarse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos para purificar polipéptidos de ectodominio de F de VRS mediante cromatografía de inmunoafinidad. Ruiz-Arguello *et al.*, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004). En la técnica se conocen bien métodos adecuados para purificar proteínas deseados incluyendo precipitación y diversos tipos de cromatografía, tal como de interacción hidrófoba, intercambio iónico, afinidad, quelación y exclusión molecular. Pueden crearse esquemas de purificación adecuados usando dos o más de estos u otros métodos adecuados. Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS pueden incluir una "etiqueta" que facilita la purificación, tal como una etiqueta de epítipo o una etiqueta HIS. Tales polipéptidos etiquetados pueden purificarse convenientemente, por ejemplo, a partir de medios acondicionados, mediante cromatografía de quelación o cromatografía de afinidad.

Los polipéptidos pueden incluir secuencias adicionales además de las secuencias de VRS. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir una secuencia para facilitar la purificación (por ejemplo, una secuencia de poli-His). De manera similar, para fines de expresión, el péptido líder natural de proteína F puede sustituirse por uno diferente. Por ejemplo, la referencia 6 usó un péptido líder de melitina de abeja en lugar del natural.

Forma y conformación de polipéptidos

La invención incluye composiciones inmunogénicas que incluyen cualquiera de las formas y conformaciones de polipéptidos y proteínas F de VRS como en las reivindicaciones adjuntas incluyendo cualquier combinación deseada de las formas y conformaciones de polipéptidos y proteínas F de VRS dadas a conocer en el presente documento. La proteína F de VRS es un trímero que comprende tres polipéptidos monoméricos. Los trímeros pueden estar monodispersos o pueden estar en forma de una roseta, por ejemplo, debido a interacciones entre los péptidos de fusión de trímeros individuales. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender polipéptidos que son trímeros, rosetas de trímeros, y cualquier combinación de los anteriores. Además, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la proteína F de VRS puede estar en una conformación de posfusión, una conformación de prefusión o conformación intermedia.

La proteína F de VRS puede estar en una conformación de prefusión, una conformación de posfusión o una conformación intermedia. Se cree que la "conformación de posfusión" de la proteína F de VRS es la conformación de baja energía de F de VRS nativa, y es un trímero caracterizado por la presencia de un haz de seis hélices que comprende 3 regiones HRB y 3 HRA. La conformación de posfusión tiene una forma de "muleta" o "soporte de golf" característica mediante microscopía electrónica. La "conformación de prefusión" de la proteína F de VRS es una conformación caracterizada por un trímero que contiene una superhélice que comprende 3 regiones HRB. El péptido de fusión no está expuesto en la conformación de prefusión y, por tanto, las conformaciones de prefusión generalmente no forman rosetas, y tienen una forma de "piruleta" o "bola y tallo" mediante microscopía electrónica.

En algunos aspectos, la proteína F de VRS está en la conformación de posfusión. Por ejemplo, la proteína F de VRS

puede estar en forma de un trímero monodisperso en la conformación de posfusión, o en forma de una roseta compuesta por trímeros de posfusión.

En otros aspectos, la proteína F de VRS está en la conformación de prefusión. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que la conformación de prefusión o formas intermedias de la proteína F de VRS pueden contener epítomos que son los mismos que los de la proteína F de VRS expresada en viriones de VRS naturales, y por tanto proporcionan ventajas para generar anticuerpos neutralizantes.

Algunos aspectos de la invención usan un polipéptido que desfavorece la conformación de posfusión de la proteína F. Preferiblemente, los polipéptidos (en su totalidad o en parte) mostrarán un epítomo de la proteína F de prefusión o un epítomo de una conformación intermedia en la conversión desde la conformación de prefusión hasta la conformación de posfusión. Estos polipéptidos pueden ser proteínas F nativas o mutadas en un estado de prefusión, pueden ser proteínas F nativas o mutadas en una conformación intermedia o pueden ser una población de proteínas nativas o mutadas donde la conformación de posfusión se ha desfavorecido o excluido preferentemente. En ciertos casos, la proteína nativa o mutada puede combinarse con una o más moléculas adicionales que ayudan a mantener los polipéptidos en uno de los estados anteriores tales como un anticuerpo monoclonal que se une preferentemente a la conformación de prefusión o una conformación intermedia. Además, los polipéptidos pueden ser derivados de proteínas F nativas. Tales derivados incluyen polipéptidos que comprenden uno o más fragmentos de una proteína F nativa, polipéptidos de fusión que comprenden una proteína F nativa (o fragmento de la misma) y una secuencia heteróloga, y polipéptidos que comprenden una secuencia de proteína F nativa que tiene una o más mutaciones. Estas (u otras) modificaciones pueden desfavorecer la conformación de posfusión. Los enfoques a modo de ejemplo para desfavorecer la conformación de posfusión incluyen estabilizar la conformación de prefusión, estabilizar una conformación intermedia, desestabilizar la conformación de posfusión o aumentar la barrera de activación de una o más etapas que conducen a la conformación de posfusión.

En otra realización, la invención es un polipéptido que muestra al menos un epítomo que es específico para la proteína F en conformación de prefusión o una proteína F en conformación intermedia. Un epítomo que es específico para la proteína F en conformación de prefusión o una proteína F en conformación intermedia es un epítomo que no se presenta en la conformación de posfusión. Se prefiere que el al menos un epítomo se presente de manera estable, por ejemplo, el epítomo se presenta de manera estable en disolución durante al menos doce horas, al menos un día, al menos dos días, al menos cuatro días, al menos seis días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas o al menos seis semanas.

Tales polipéptidos pueden ser proteínas F nativas o mutadas en el estado de prefusión, un estado intermedio o una población de estados donde el estado de posfusión está subrepresentado o en un porcentaje menor que para proteínas F nativas aisladas, o puede ser un derivado de una proteína F nativa. Tales derivados incluyen polipéptidos que comprenden uno o más fragmentos de una proteína F nativa, polipéptidos de fusión que comprenden una proteína F nativa (o fragmento de la misma) y una secuencia heteróloga, y polipéptidos que comprenden una secuencia de proteína F nativa que tiene una o más mutaciones. Estas (u otras) modificaciones pueden estabilizar una secuencia de aminoácidos de proteína F en su conformación de prefusión, estabilizar una secuencia de aminoácidos de proteína F en una conformación intermedia, desestabilizar la conformación de posfusión de una secuencia de aminoácidos de proteína F, aumentar la barrera de energía en una transición que conduce a la conformación de posfusión de una secuencia de aminoácidos de proteína F, o una combinación de dos o más de los anteriores.

Los dominios TM y/o CT de las proteínas F son importantes para la estabilidad de la conformación de prefusión (8). Sin embargo, ya que puede ser deseable no incluir dominios transmembranas en inmunógenos solubles, el efecto funcional de TM puede lograrse por otros medios. Por ejemplo, el comportamiento de pre- y posfusión de la proteína F del virus parainfluenza 5 se ha estudiado en algún detalle (6), y los autores estabilizaron la estructura de prefusión de ED fusionando un dominio de trimerización heterólogo al extremo C-terminal del ED.

Dominio de oligomerización

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una proteína F de VRS recombinante soluble, en forma de trímero, que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde

(i) el primer dominio comprende el ectodominio F de VRS en su totalidad o en parte y

(ii) el segundo dominio comprende un dominio de oligomerización heterólogo que es la secuencia trimerizante de la fibritina del bacteriófago T4 ("foldon");

en donde el ectodominio F de VRS en su totalidad o en parte comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 23-525 de SEQ ID NO: 2; y

en donde la composición inmunogénica es para su uso como medicamento.

El segundo dominio permite la oligomerización del polipéptido, facilitando de ese modo que el primer dominio adopte un estado de prefusión o un estado intermedio. El polipéptido estará presente como un oligómero, y en particular como un trímero.

- 5 Están disponibles diversos dominios de oligomerización para el experto en la técnica y se dan a conocer en el presente documento. Estos son secuencias de aminoácidos que pueden formar una estructura que puede interaccionar con los dominios de oligomerización (ya sean iguales o diferentes) en otros polipéptidos (ya sean iguales o diferentes) de manera que los múltiples polipéptidos puedan asociarse (habitualmente de manera no covalente) para formar oligómeros, por ejemplo, trímeros. Por ejemplo, la trimerización de la proteína F de VIH (es decir, gp160) se ha logrado fusionándola con la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamoylase (ATCasa) de *E. coli*, que es de manera natural un trímero estable (9). De manera similar, la trimerización de las proteínas F de VIH (10) y PIV5 (6) se ha logrado fusionando sus ectodominios con GCNt. Por tanto, la divulgación incluye la superhélice de la proteína de cremallera de leucina GCN4 de levadura (11). La trimerización del ectodominio de la proteína HA del virus influenza A se ha logrado usando una secuencia de trimerización ('foldon') de fibrina de bacteriófago T4 (GSGYIPEAPRDGQ AYVRKDGEWLLSTFL - SEQ ID NO: 19) (12). Por tanto, el dominio de oligomerización usado con la presente invención comprende un foldon de este tipo.

- Los oligómeros proteicos que se producen de manera natural (tanto heterooligómeros como homooligómeros) se asocian en una variedad de modos diferentes, por ejemplo, mediante asociación de láminas β en diferentes monómeros, mediante asociación de hélices α en diferentes monómeros, mediante asociación de parches superficiales hidrófobos, etc. Un motivo estructural común implicado en la oligomerización de proteínas es el dominio de superhélice. El motivo estructural de superhélice α puede formar por sí misma espirales, y dos, tres, cuatro o cinco hélices α pueden envolverse unas alrededor de otras para formar una hélice superenrollada levógira conocida como "superhélice", aunque se han diseñado hélices superenrolladas dextrógiras artificiales (13-19). La simplicidad del dominio de superhélice lo ha convertido en una elección popular para diseñar proteínas quiméricas con estados de oligomerización definidos (16).

- En una estructura de superhélice, las hélices α interaccionan a través de residuos hidrófobos que forman una franja apolar a lo largo de un lado de cada hélice, y puede haber también interacciones electrostáticas estabilizantes entre cadenas laterales en cualquier lado de esta franja. Dentro de la repetición de héptada abcdefg de una hélice α , la franja apolar está definida por cadenas laterales hidrófobas en los residuos a y d, siendo principalmente cualquier interacción electrostática en los residuos e y g. La posición a es lo más frecuentemente Leu, Ile o Ala y la posición d es habitualmente Leu o Ala. Los residuos e y g son a menudo Glu o Gln, con Arg y Lys también prominentes en la posición g. Son comunes residuos cargados en las posiciones b, c y f ya que estos residuos están en contacto con el disolvente. Sin embargo, hay excepciones a este patrón de héptada general, y algunas veces se encuentran residuos de Pro dentro de la héptada. Tales excepciones tienen habitualmente significación funcional incluyendo, a modo de ejemplo, desestabilización del dominio de oligomerización para permitir el replegamiento y reordenamiento tal como se produce en la proteína F.

- 40 En la técnica se conocen cientos de secuencias de dominio de superhélice. Como alternativa a usar un dominio de superhélice natural, pueden usarse dominios de superhélice artificiales (21, 22). Debido a la estructura sumamente repetitiva de un dominio de superhélice, el dominio es particularmente propenso a modelado informático ya que las porciones de estructura principal de cada residuo de aminoácido pueden parametrizarse en lugar de tratar cada porción de estructura principal de un residuo como una unidad única con sus propias variables.

- 45 El dominio de superhélice dado a conocer es preferiblemente uno que forma un trímero, de manera que el polipéptido también puede ensamblarse en un trímero. Los dominios de superhélice dados a conocer son aquellos tomados de proteínas transmembrana bacterianas. Un subconjunto dado a conocer de proteínas transmembrana son las adhesinas (es decir, proteínas de superficie celular que median en la adhesión a otras células o a superficies), y particularmente adhesinas no fimbriales (por ejemplo, en la familia de adhesinas de superhélice de oligomerización, u 'Oca'). Las secuencias específicas incluyen las dadas a conocer en la referencia 24 de adhesina de *Yersinia enterocolitica* YadA, adhesina de *Neisseria meningitidis* NadA, proteína de superficie de *Moraxella catarrhalis* UspA2, y otras adhesinas, tales como la adhesina HadA de *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius*, etc. (SEQ ID NO 28-31 y 42-58 de la referencia 24). Además, el factor de transcripción de choque térmico eucariota tiene un dominio de trimerización de superhélice que puede expresarse por separado.

- Dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene una región de superhélice, la naturaleza de repetición de héptada de las hélices α significa que el límite del dominio de superhélice puede determinarse con cierta precisión, pero el residuo preciso donde puede decirse que termina una disposición de superhélice puede no conocerse con precisión absoluta. Sin embargo, esta falta de precisión absoluta no es un problema ya que las pruebas de rutina pueden revelar si la superhélice requiere algún residuo de aminoácido particular del que podría haber dudas. Incluso así, no es un requisito que los límites se conozcan con precisión absoluta, ya que el único requisito básico es que el dominio de superhélice funcione de un modo que permita que el polipéptido se oligomerice con otros dominios de superhélice sin destruir la función de los otros dominios dentro del polipéptido.

65

Otra clase de dominio de oligomerización se encuentra en la triple hélice levógira conocida como hélice de colágeno (25). Estas secuencias que forman triple hélice implican una secuencia de repetición de tripéptido básica de ¹Gly-²Xaa-³Xaa, donde ²Xaa es a menudo Pro y ³Xaa es a menudo 4-hidroxiprolina. Aunque este motivo se conoce como hélice de "colágeno", se encuentra en muchas proteínas más allá del colágeno. Por tanto, el dominio de oligomerización

El colágeno también proporciona otra clase de dominio de oligomerización. La referencia 26 describe un motivo que se encuentra en el dominio 1 no colagenoso (NC1) del colágeno tipo X, y este motivo puede usarse para la formación de trímeros y multímeros de orden superior sin una triple hélice. Esta asociación trimérica es altamente termoestable sin enlaces disulfuro intermoleculares. El dominio de oligomerización puede comprender por tanto una secuencia de NC1.

Otros dominios de oligomerización pueden derivarse de los dominios transmembrana de proteínas TM oligoméricas. Ya que estas son habitualmente lipófilas, los residuos hidrófobos situados en el exterior de sus regiones TM pueden sustituirse por residuos cargados para proporcionar un dominio soluble. Tales métodos de solubilización de dominios transmembrana mediante ingeniería de proteínas se conocen en la técnica, por ejemplo, de la referencia 27. Este método también se ha usado para GCN4, donde las posiciones de repetición de héptada "a" y "d" se reemplazaron por isoleucina (11): KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA (SEQ ID NO: 20).

Los dominios de oligomerización usados con la invención generalmente pueden mantener una estructura oligomérica sin la necesidad de la formación de puentes disulfuro entre monómeros, pero los oligómeros que contienen monómeros unidos por disulfuro no se excluyen de la invención.

Además de usar un dominio de oligomerización para estabilizar una proteína F en su conformación de prefusión, puede usarse mutación. Por ejemplo, la referencia 28 notifica que la mutación en una región conservada de la subunidad F2 de las proteínas F en el virus de simio 5 o el virus Hendra puede influir en la estabilidad de la conformación de prefusión.

En algunas circunstancias, también puede usarse un pH bajo para favorecer la conformación de prefusión.

Estabilización del trímero de dominio HRB

En otro aspecto preferido de la presente divulgación, la conformación de posfusión de la proteína F puede verse desfavorecida por la estabilización del trímero de dominio HRB. El dominio HRB forma una superhélice tricaténaria en las formas de prefusión y probablemente la intermedia. Tal como se comentó en la sección anterior, debido a su simplicidad, las superhélices se han estudiado extensamente como sistemas modelo para interacciones intermoleculares entre proteínas y como sistemas modelo para interacciones intramoleculares de mayor alcance (es decir, interacciones de plegamiento terciario). Estos estudios son útiles en la enseñanza de métodos que puedan usarse para estabilizar el dominio HRB en la forma de superhélice trimérica. A modo de ejemplo, uno o más residuos en las posiciones *a* y/o *d* de la repetición de héptada pueden reemplazarse por residuos que favorecen la formación de superhélices triméricas estables tales como residuos de Ile. Además, aunque menos preferido, pueden eliminarse interacciones iónicas desfavorables en las posiciones *e* y *g* o pueden añadirse interacciones iónicas favorables en las posiciones *e* y *g*.

La región preferida del dominio HRB para la manipulación es la repetición de héptada entre P484-N517. Ejemplos preferidos de residuos *a* y *d* para seleccionarlos como diana para las mutaciones son F488, 1492, V495, 1499, S502, 1506, S509, L512 y V516. Los residuos de serina se prefieren especialmente ya que el reemplazo de los residuos hidrófilos por residuos hidrófobos estabilizaría el núcleo hidrófobo de la superhélice. Otra diana preferida sería la fenilalanina con un residuo hidrófobo más pequeño que se empaquetaría mejor en el núcleo tal como una isoleucina.

Desestabilización del trímero de dominio HRA

En otro aspecto preferido de la presente divulgación, la conformación de posfusión de la proteína F puede verse desfavorecida por la desestabilización del trímero de dominio HRA. El dominio HRA forma una superhélice tricaténaria en las formas de posfusión y posiblemente una o más formas intermedias. A modo de ejemplo, uno o más residuos en las posiciones *a* y/o *d* de la repetición de héptada pueden reemplazarse por residuos que desfavorecen la formación de superhélices triméricas estables. Además, aunque menos preferido, pueden eliminarse interacciones iónicas favorables en las posiciones *e* y *g* o pueden añadirse interacciones iónicas desfavorables en las posiciones *e* y *g*. Preferiblemente, tales mutaciones se seleccionarán para que tengan un impacto mínimo sobre la estabilidad del dominio HRA en la conformación de prefusión ya que pueden modelarse basándose en las estructuras cristalinas disponibles de la proteína PIV5 F en las formas de prefusión y posfusión.

Otras modificaciones

Además de las modificaciones anteriores, pueden diseñarse además modificaciones basándose en el modelado molecular de las proteínas F de VRSh basándose en las estructuras cristalinas disponibles de la proteína F de PIV5 en las formas de prefusión y posfusión. Pueden hacerse mutaciones que desestabilizan la conformación de posfusión tales como el pliegue 6HB de los dominios HRA y HRB o que estabilizan la conformación de prefusión tales como el

- 5 pliegue de HRA en la conformación de prefusión. Además, la barrera de energía de las transiciones que conducen a la conformación de posfusión pueden aumentarse. Aunque un experto en la técnica apreciará que la estabilización de la conformación inicial o la desestabilización de la conformación final puede tener el efecto de aumentar la barrera de energía, pueden introducirse otras modificaciones que afectan al propio estado de transición.
- 10 Como ejemplo adicional, los aminoácidos N-terminales con respecto al dominio HRB (aproximadamente a.a. 449-482, preferiblemente V459-F483) actúan como "anclaje" que permite que el dominio HRB se desplace desde un lado del trímero de proteína F hasta el otro lado de modo que el dominio HRB pueda participar en el 6HB de la conformación de posfusión. La delección de uno o más de estos aminoácidos afectará a o impedirá completamente la participación del dominio HRB en el pliegue 6HB de la conformación de posfusión de la proteína F (véase la figura 3). Además, la
- 15 interacción entre el anclaje y la proteína F en la conformación de prefusión puede estabilizarse para impedir que el anclaje se aleje para permitir que el dominio HRB participe en el pliegue 6HB. Ejemplos de mutaciones estabilizantes que podrían hacerse son puentes de cisteína entre el anclaje y la porción de la proteína F con la que entra en contacto el anclaje en la conformación de prefusión.
- 20 Aún otro ejemplo es la estabilización del HRA en la conformación de prefusión (residuos T50-Y306). De nuevo, basándose en las estructuras cristalinas de proteínas F homólogas, el núcleo hidrófobo puede estabilizarse reemplazando residuos iónicos o hidrófilos enterrados por residuos hidrófobos de tamaño similar. Además, pueden introducirse puentes de cisteína en la superficie o dentro del núcleo. Además, tal como se demostró con un extenso análisis de la estructura cristalina de mutantes de lisozima, las proteínas o núcleos hidrófobos son relativamente rígidos
- 25 y, por tanto, la introducción de agujeros desestabilizó de manera predecible los mutantes de lisozima. De manera similar, el reempaquetamiento del núcleo de la proteína F en la conformación de prefusión para eliminar cualquier agujero natural puede estabilizar la proteína F en las formas de prefusión o intermedia, desfavoreciendo por tanto la conformación de posfusión.

30 **Métodos para preparar composiciones**

Se dan a conocer métodos para preparar composiciones y composiciones que contienen proteína F de VRS, en particular polipéptidos de ectodominio de F de VRS solubles, incluyendo composiciones inmunogénicas. Preferiblemente, los polipéptidos de ectodominio de F de VRS están en una sola forma, trímeros no escindidos,

35 trímeros escindidos o rosetas de trímeros escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, la invención proporciona métodos para producir composiciones que contienen una forma deseada predominante de proteína F de VRS, o una única forma deseada de proteína F del RSV, tales como trímeros no escindidos, trímeros escindidos o rosetas de trímeros escindidos, o una mezcla de la forma deseada de proteína F de VRS. Estos tipos de composiciones pueden usarse para una variedad de fines, tales como en la

40 producción de composiciones inmunogénicas que pueden usarse para producir vacunas. La presencia de una sola forma deseada de F de VRS, o un equilibrio dinámico entre formas conocidas, en una composición inmunogénica, proporciona una formulación, solubilidad y estabilidad más predecibles, y una respuesta inmunitaria más predecible cuando se administra la composición a un sujeto.

- 45 Cuando se producen polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS mediante expresión recombinante convencional en células huésped, los polipéptidos se escinden en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y en aproximadamente la posición 136/137 durante la producción en la célula huésped antes de que se secreten a los medios de cultivo. La escisión de los polipéptidos por las células huésped es permisiva para el repliegamiento del polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS, lo que da como resultado la exposición del péptido de fusión hidrófobo. Por consiguiente, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos, debido a la
- 50 presencia de un péptido de fusión expuesto, forman rosetas y se asocian con lípidos y lipoproteínas que se derivan de las células huésped y los medios de cultivo. De hecho, la microscopía electrónica del ectodominio de F de VRS escindido que se produce en células de insecto y se purifica en virtud de una etiqueta HIS₆ mostró que los polipéptidos tenían una forma de muleta consecuente con una forma de posfusión y estaban unidos a lo que parecían restos
- 55 celulares residuales. Por consiguiente, no pueden obtenerse fácilmente preparaciones de alta pureza de rosetas y otras formas y conformaciones de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS mediante expresión recombinante convencional en células huésped.

Métodos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos

- 60 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos. En general, el método implica proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos y luego escindirlos para producir una subunidad F₁ y una subunidad F₂. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos pueden
- 65 purificarse y separarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas contaminantes usando métodos adecuados, tales como cromatografía de exclusión molecular. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que el péptido de

fusión hidrófobo no se expone en los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos y, por tanto, los polipéptidos no escindidos no se asocian con contaminantes lipídicos y lipoproteicos. Tal como se describe además en el presente documento, los ectodominios de proteína F de VRS no escindidos pueden escindirse para producir las subunidades F₁ y F₂, que pueden purificarse como trímeros, rosetas de trímeros o una mezcla de trímeros y rosetas de trímeros.

Pueden producirse polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, mediante producción recombinante en células huésped que no contienen furina activa o proteasas similares a furina en el momento en que están produciéndose los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS. Puede usarse una variedad de métodos para lograr este método de producción, tales como, producción en células huésped recombinantes que están mutadas para impedir la expresión de furina o proteasa similar a furina ("desactivación" condicional o completa), y diversos métodos que reducen o impiden la expresión de furina o proteasas similares a furina en las células huésped, por ejemplo, usando interferencia de ARN u otros métodos similares, o inhibiendo la actividad de furina o proteasa similar a furina en células huésped usando inhibidores de las proteasas.

Se producen preferiblemente polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos mediante expresión recombinante de constructos que codifican un ectodominio de proteína F de VRS en el que la secuencia de aminoácidos de los sitios de escisión de furina están alterados, de modo que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS se secretan por una célula huésped que produce los polipéptidos sin escindir. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos pueden producirse usando cualquier célula huésped adecuada, tal como células de insecto (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*), células de mamífero (por ejemplo, ser humano, primate no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato y roedor (por ejemplo, hámster), células de ave (por ejemplo, pollo, pato y gansos), bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolitica*), células de *Tetrahymena* (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de las mismas. En la técnica se conocen bien muchas células de insecto y células de mamífero adecuadas. Las células de insecto adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células Schneider S2 y células High Five (un aislado clonal derivado de la línea celular original de *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen)). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (células HEK293, normalmente transformadas por ADN de adenovirus de tipo 5 fragmentado), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito de ECACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de rhesus fetal (ATCC CL-160), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón canino Madin-Darby ("MDCK") (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de cría de hámster (BHK), tales como BHK21-F, células HKCC, y similares. Las células de ave adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, células de pato (por ejemplo, líneas celulares AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen) que se describen, por ejemplo, en Vaccine 27:4975-4982 (2009) y el documento WO2005/042728), células EB66, y similares.

Los expertos en la técnica conocen sistemas de expresión de células de insectos adecuados, tales como sistemas de baculovirus, y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit de, entre otros, invitrogen, San Diego CA. Los expertos en la técnica también conocen sistemas de expresión de células de ave y se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; la patente europea n.º EP 0787180B; la solicitud de patente europea n.º EP03291813.8; los documentos WO 03/043415; y WO 03/076601. De manera similar, en la técnica también se conocen sistemas de expresión de células bacterianas y de mamífero y se describen en, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr *et al.*, eds., 1989) Butterworths, Londres.

Generalmente, la secuencia de aminoácidos de un ectodominio de proteína F de VRS no escindido se altera para impedir la escisión en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de proteasa que se produce de manera natural o introducido, que cuando se escinde produce una subunidad F₁ y una subunidad F₂. Por ejemplo, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido puede tener una secuencia de aminoácidos que se altera para impedir la escisión en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137, pero contiene uno o más sitios de escisión de proteasa que se producen de manera natural o escindidos desde aproximadamente la posición 101 hasta aproximadamente la posición 161.

Un experto habitual en la técnica puede diseñar y prever fácilmente una variedad de secuencias de aminoácidos particulares que permitirán la producción y expresión de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos por células huésped, incluyendo secuencias de aminoácidos que no se escinden en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137. En general, uno o más aminoácidos que son parte de, o están ubicados cerca de, los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137 se reemplazan o delecionan independientemente. Se

conocen algunas sustituciones y deleciones de aminoácidos que son adecuadas para impedir la escisión de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS. Por ejemplo, se han descrito las sustituciones R108N, R109N, R108N/R109N, que inhiben la escisión en 109/110, y la sustitución K131Q o la deleción de los aminoácidos en las posiciones 131-134, que inhiben la escisión en 136/137. Gonzalez-Reyes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9859-9864 (2001). Se ha descrito un polipéptido de ectodominio de F de VRS no escindido que contiene las sustituciones de aminoácidos R108N/R109N/ K131Q/R133Q/R135Q/R136Q. Ruiz-Arguello *et al.*, J. Gen. Virol. 85:3677687 (2004). Tal como se describe en detalle en el presente documento, secuencias de aminoácidos de proteína F de VRS adicionales que dan como resultado la secreción del polipéptido de ectodominio de F de VRS de una célula huésped sin escindir contienen sitios de escisión de furina alterados, por ejemplo, secuencias de aminoácidos alteradas en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136. Los sitios de escisión de furina alterados contienen al menos una sustitución o deleción de aminoácido en aproximadamente las posiciones 106-109, y al menos una sustitución o deleción de aminoácido en aproximadamente las posiciones 133-136.

De manera similar, son posibles una variedad de secuencias de aminoácidos particulares de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos que contienen un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, que se produce de manera natural o introducido) que cuando se escinden producen una primera subunidad que comprende una F₁ y una segunda subunidad que comprende F₂, y pueden diseñarse y preverse fácilmente. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de proteína F de VRS desde aproximadamente la posición 101 hasta aproximadamente la posición 161 contiene sitios de escisión de tripsina, y uno o más de los sitios de escisión de tripsina pueden escindirse mediante tripsina para generar las subunidades F₁ y F₂. Si se desea, pueden introducirse uno o más sitios de reconocimiento de proteasa adecuados en el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones 101 y aproximadamente la posición 161. Los sitios de reconocimiento de proteasa introducidos pueden escindirse usando la proteasa apropiada para generar las subunidades F₁ y F₂. Cuando se introduce un sitio de reconocimiento de proteasa en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido, se prefiere que el sitio se reconozca por una proteasa que no escinde el ectodominio de proteína F de VRS que se produce de manera natural.

El método dado a conocer incluye: a) proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos que contienen un sitio de escisión de proteasa que, cuando se escinde, produce las subunidades F₁ y F₂, y b) escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos con una proteasa que reconoce el sitio de escisión de proteasa. En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos contiene sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS se secretan de una célula huésped que los produce sin escindir en los sitios de escisión de furina en aproximadamente las posiciones 106-109 y aproximadamente las posiciones 131-136.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados pueden purificarse hasta el grado deseado. Por ejemplo, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados pueden proporcionarse como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular que está sustancialmente sin procesar (por ejemplo, sin procesar o solo clarificado), o en forma parcial o sustancialmente purificada. En ejemplos particulares, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados se proporcionan en medios acondicionados de cultivo celular seleccionados del grupo que consiste en medios acondicionados de células de insecto, medios acondicionados de células de mamífero, medios acondicionados de células de ave, medios acondicionados de células de levadura, medios acondicionados de células de *Tetrahymena*, y combinaciones de los mismos.

Se prefiere generalmente que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados se purifiquen, por ejemplo, se purifiquen para que sean al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, mientras que las formas escindidas producidas convencionalmente de proteína F de VRS se purifican conjuntamente con contaminantes lipídicos y lipoproteicos. Por consiguiente, cuando se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos purificados, el método puede usarse para producir fácilmente una composición que contiene ectodominios de proteína F de VRS escindidos que están sustancialmente libres de lípidos o lipoproteínas.

Se conocen bien métodos adecuados para escindir polipéptidos usando una proteasa y son convencionales en la técnica. Generalmente, los polipéptidos que van a escindirse se combinan con una cantidad suficiente de proteasa en condiciones (por ejemplo, pH, concentración de polipéptido y proteasa, temperatura) adecuadas para la escisión del polipéptido. Muchas proteasas adecuadas están comercialmente disponibles, y se conocen bien condiciones adecuadas para realizar la escisión de polipéptidos para muchas proteasas. Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos pueden purificarse tras la escisión con proteasa.

En un ejemplo del método dado a conocer, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos que contienen un péptido de fusión intacto, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido en el que ninguno de los aminoácidos de las posiciones 137-154 están sustituidos o delecionados. En algunas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados se

purifican. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados que contienen un péptido de fusión intacto se escinden, y la escisión da como resultado la formación de rosetas de trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS escindidos. Si se desea, las rosetas pueden purificarse además usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión molecular.

En otro ejemplo del método, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos que contienen un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido en el que aproximadamente los aminoácidos 137-152, aproximadamente los aminoácidos 137-153, aproximadamente los aminoácidos 137-145 o aproximadamente los aminoácidos 137-142 se delecionan. También se han descrito otras delecciones de péptidos de fusión adecuadas, tales como la delección de los aminoácidos en las posiciones 137-146. Ruiz-Arguello *et al.*, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004).

En algunas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados se purifican. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados se escinden, y la escisión da como resultado la formación de trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS escindidos. Si se desea, los trímeros pueden purificarse usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión molecular.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos dados a conocer se escinden, por ejemplo, con tripsina, y la escisión da como resultado la formación de trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos o una combinación de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS. Si se desea, los trímeros escindidos y/o rosetas de trímeros escindidos pueden purificarse además usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión molecular.

Métodos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos. En general, el método implica proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, tal como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular, y luego purificar los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos. Tal como se describe en el presente documento, se ha descubierto que los monómeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos purificados pueden autoasociarse para formar trímeros no escindidos, y que existe una mezcla de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos o un equilibrio entre los monómeros no escindidos y los trímeros no escindidos. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, se cree que el equilibrio favorece al monómero, pero que el equilibrio se desplazará hacia el trímero en soluciones concentradas.

El método de este aspecto de la divulgación incluye: a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, tal como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular; y b) purificar trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos o una combinación de monómeros y trímeros del material biológico.

En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos contiene sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS se secretan de una célula huésped que los produce sin escindir entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 (incluyendo en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136).

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS contiene sitios de escisión de furina alterados, y otros sitios de escisión de proteasa (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se alteran o se delecionan para impedir la escisión por proteasa (por ejemplo, tripsina). Por ejemplo, se sabe bien que la tripsina escinde después de residuos de lisina y arginina. En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido contiene sitios de escisión de furina alterados, uno o más residuos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los residuos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se delecionan o se reemplazan por un aminoácido que no es lisina ni arginina, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS se secretan de una célula huésped que los produce sin escindir entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no se escinden por la tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161. Preferiblemente, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no se escinden por la tripsina cuando se trata una disolución de 1 mg/ml de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS (diluido en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM) con una milésima del volumen de la disolución de tripsina (tripsina de plasma bovino diluida hasta una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM; la razón en masa final en la reacción de digestión es tripsina: ectodominio de F de VRS 0,001:1; tripsina usada a 10-15 unidades BAEE por mg de proteína) durante 1 hora a 37 °C.

Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos (por ejemplo, los polipéptidos que

contienen sitios de escisión de furina alterados, y polipéptidos que contienen sitios de escisión de furina alterados y sitios de escisión de tripsina alterados) pueden contener además un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido en el que, por ejemplo, se delecionan aproximadamente los aminoácidos 137-152, se delecionan aproximadamente los aminoácidos 137-154, se delecionan aproximadamente los aminoácidos 137-145 o se delecionan aproximadamente los aminoácidos 137-142. También se han descrito otras delecciones de péptidos de fusión adecuadas, tales como la delección de los aminoácidos en las posiciones 137-146. Ruiz-Arguello *et al.*, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004).

En realizaciones particulares, el método incluye: a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, tal como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido contiene sitios de escisión de furina alterados, los residuos de lisina y arginina presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se delecionan o se reemplazan por un aminoácido que no es lisina ni arginina, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS se secretan de una célula huésped que los produce sin escindir entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no se escinden por la tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161; y b) purificar trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos o una combinación de monómeros y trímeros del material biológico.

El método dado a conocer incluye: a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos en los que el péptido de fusión está mutado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión se deleciona), tal como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular; y b) purificar polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos del material biológico. El polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido puede contener sitios de escisión de furina alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS se secretan de una célula huésped que los produce sin escindir entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 (incluyendo en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). Si se desea, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido con sitios de escisión de furina alterados contiene además sitios alterados o delecionados para otras proteasas (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 para impedir la escisión por proteasa (por ejemplo, tripsina). Por ejemplo, uno o más residuos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los residuos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se delecionan o se reemplazan por un aminoácido que no es lisina ni arginina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no se escinden por la tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161.

Los trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos pueden purificarse hasta el grado deseado. Generalmente, se prefiere que los trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos se purifiquen, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular. Por consiguiente, el método puede usarse para producir fácilmente una composición que contiene trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS escindidos o una combinación de monómeros y trímeros que están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

En un ejemplo, el método incluye proporcionar medio acondicionado de cultivo de células de insecto, medio acondicionado de cultivo de células de mamífero, medio acondicionado de células de ave, medio acondicionado de células de levadura, medio acondicionado de células de *Tetrahymena*, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos se purifican.

Métodos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos con péptidos de fusión alterados

Se da a conocer un método para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos que contienen un péptido de fusión alterado. Cuando se expresan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS que no contienen sitios de escisión de furina en células huésped, las células huésped procesan los polipéptidos, en parte escindiendo el polipéptido en los sitios de furina en aproximadamente las posiciones 109/110 y aproximadamente las posiciones 136/137 para producir las subunidades F₁ y F₂. Los polipéptidos procesados se secretan en el cultivo y pueden recuperarse como subunidades F₁-F₂ asociadas (por ejemplo, subunidades F₁ y F₂ con enlaces disulfuro), que pueden formar rosetas de trímeros a través de agregación de péptidos de fusión expuestos. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS que contienen péptidos de fusión alterados pueden producirse en y secretarse de las células huésped como subunidades F₁-F₂ asociadas, y preferiblemente no se agregan en rosetas ni con contaminantes lipídicos o lipoproteicos. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que los polipéptidos no forman rosetas ni se asocian con contaminantes lipídicos y lipoproteicos porque el péptido de fusión alterado no media en la agregación.

El método incluye: a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos que contienen un péptido de fusión alterado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión se deleta), tal como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular; y b) purificar polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos del material biológico. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos purificados pueden purificarse como trímeros escindidos, rosetas de trímeros escindidos o una mezcla de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS adecuados que contienen péptidos de fusión alterados contienen sitios de escisión de furina escindibles en aproximadamente 109/110 y aproximadamente 136/137 y contienen además un péptido de fusión alterado tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse en el método un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS en el que se deletan aproximadamente los aminoácidos 137-152, se deletan aproximadamente los aminoácidos 137-153, se deletan aproximadamente los aminoácidos 137-145, se deletan aproximadamente los aminoácidos 137-146 o se deletan aproximadamente los aminoácidos 137-142. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos incluye al menos la delección de péptido de fusión 1.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos (por ejemplo, trímeros escindidos o una mezcla de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos) pueden purificarse hasta el grado deseado. Se prefiere generalmente que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos se purifiquen, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos que contienen un péptido de fusión alterado pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular. Por consiguiente, el método puede usarse para producir fácilmente una composición que contiene trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS escindidos, rosetas de trímeros escindidos o una combinación de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos que están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

Métodos para producir polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS con mutaciones de furina C-terminales

Se da a conocer un método para preparar una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de VRS no escindidos C-terminales y un método para preparar polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales se escinden por las células que producen las proteínas en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110, pero no en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, y se secretan al medio como una subunidad F₁ que está asociada con una subunidad F₂. Se cree además que el péptido de fusión hidrófobo no se expone en los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales y, por tanto, los polipéptidos no escindidos C-terminales no se asocian con contaminantes lipídicos y lipoproteicos. Tal como se describe además en el presente documento, los ectodominios de proteína F de VRS no escindidos C-terminales pueden escindirse además para producir una subunidad F₁, en la que el extremo amino terminal es de desde la posición 110 hasta aproximadamente la posición 161, que está asociada con una subunidad F₂. Tales subunidades F₁ y F₂, que pueden purificarse como trímeros, rosetas de trímeros o una mezcla de trímeros y rosetas de trímeros.

Generalmente, la secuencia de aminoácidos de un ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal se altera para impedir la escisión en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de proteasa que se produce de manera natural o introducido, que cuando se escinde produce una subunidad F₁, en la que el extremo amino terminal es de desde la posición 110 hasta aproximadamente la posición 161, y una subunidad F₂. Por ejemplo, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal puede tener una secuencia de aminoácidos que se altera para impedir la escisión en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, pero contiene uno o más sitios de escisión de proteasa que se producen de manera natural o introducidos desde aproximadamente la posición 101 hasta aproximadamente la posición 161. En un ejemplo particular, la secuencia de aminoácidos de un ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal se altera para impedir la escisión en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de furina que se produce de manera natural en aproximadamente la posición 109/110.

Un experto habitual en la técnica puede diseñar y prever fácilmente una variedad de secuencias de aminoácidos particulares que permitirán la producción y expresión de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales por células huésped, incluyendo secuencias de aminoácidos que no se escinden en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137. En general, uno o más aminoácidos que son parte de, o están ubicados cerca de, los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137 se reemplazan o deletan independientemente. En el presente documento se describen sustituciones y deletas de aminoácidos adecuadas que impiden la escisión en aproximadamente la posición 136/137. Por ejemplo, pueden usarse la sustitución K131Q, la delección de los aminoácidos en las posiciones 131-134 o las sustituciones K131Q/R133Q/R135Q/R136Q, cada una de las cuales inhibe la escisión en 136/137. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales comprenden al menos una

sustitución o delección de aminoácido en aproximadamente las posiciones 133-136.

De manera similar, son posibles una variedad de secuencias de aminoácidos particulares de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales que contienen un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, que se produce de manera natural o introducido) que cuando se escinden producen una primera subunidad que comprende una F₁ y una segunda subunidad que comprende F₂, y pueden diseñarse y preverse fácilmente. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de proteína F de VRS desde aproximadamente la posición 101 hasta aproximadamente la posición 161 contiene sitios de escisión de tripsina, y uno o más de los sitios de escisión de tripsina pueden escindirse para generar las subunidades F₁ y F₂. Si se desea, pueden introducirse uno o más sitios de reconocimiento de proteasa adecuados en el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones 101 y aproximadamente la posición 161. Los sitios de reconocimiento de proteasa introducidos pueden escindirse usando la proteasa apropiada para generar las subunidades F₁ y F₂. Cuando se introduce un sitio de reconocimiento de proteasa en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal, se prefiere que el sitio se reconozca por una proteasa que no escinde el ectodominio de una proteína F de VRS que se produce de manera natural.

Pueden producirse polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales usando cualquier método adecuado. Un método preferido es mediante expresión recombinante de constructos que codifican un ectodominio de proteína F de VRS en el que esa secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de furina en aproximadamente las posiciones 136/137 se altera, de modo que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales se secretan por una célula huésped que produce los polipéptidos sin escindir en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137. Preferiblemente, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal se secreta por una célula huésped que lo produce como una subunidad F₁ que está asociada con una subunidad F₂, en el que el extremo amino terminal de la subunidad F₁ es de desde la posición 132 hasta aproximadamente la posición 161, pero no la posición 137. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales pueden producirse usando cualquier célula huésped adecuada, tal como se describe en el presente documento.

Un método incluye: a) proporcionar polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales que comprenden un sitio de escisión de furina alterado en la posición 136/137, y dichos polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales se secretan de una célula que los produce en forma de un fragmento F₂ que está asociado con una subunidad que comprende F₁ pero no está escindida en la posición 136/137, y b) escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados con una proteasa que escinde el ectodominio de proteína F de VRS en un sitio entre las posiciones 101 y 161, produciendo de ese modo dicha composición. En realizaciones particulares, la etapa b) comprende escindir los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados con una proteasa que escinde el ectodominio de proteína F de VRS en un sitio entre aproximadamente las posiciones 101 y 132, o aproximadamente las posiciones 132 y 161, o aproximadamente las posiciones 110 y 132. Alternativamente o además, en algunas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales comprenden un sitio de escisión de furina alterado en la posición 136/137, con la condición de que el sitio de escisión de furina alterado no sea la delección de los aminoácidos 131-134. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales; incluye al menos el polipéptido de furina N-terminal.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados pueden purificarse hasta el grado deseado. Por ejemplo, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados pueden proporcionarse en un lisado celular, homogeneizado celular o medios acondicionados de cultivo celular que están sustancialmente sin procesar (por ejemplo, sin procesar, o clarificados solo), o en forma parcial o sustancialmente purificada. En ejemplos particulares, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados se proporcionan en medios acondicionados cultivo celular seleccionados del grupo que consiste en medios acondicionados de células de insecto, medios acondicionados de células de mamífero, medios acondicionados de células de ave, medios acondicionados de células de levadura, medios acondicionados de células de *Tetrahymena*, y combinaciones de los mismos.

Se prefiere generalmente que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados se purifiquen, por ejemplo, se purifiquen para que sean al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, mientras que las formas escindidas producidas convencionalmente de proteína F de VRS se purifican conjuntamente con contaminantes lipídicos y lipoproteicos. Por consiguiente, cuando se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales purificados, el método puede usarse para producir fácilmente una composición que contiene ectodominios de proteína F de VRS escindidos que están sustancialmente libres de lípidos o fosfolípidos.

Se conocen bien métodos adecuados para escindir polipéptidos usando una proteasa y son convencionales en la técnica. Generalmente, los polipéptidos que van a escindirse se combinan con una cantidad suficiente de proteasa en condiciones (por ejemplo, pH, concentración de polipéptido y proteasa, temperatura) adecuadas para la escisión del

polipéptido. Muchas proteasas adecuadas están comercialmente disponibles, y se conocen bien condiciones adecuadas para realizar la escisión de polipéptidos para muchas proteasas. Si se desea, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS pueden purificarse tras la escisión con proteasa.

5 En un ejemplo del método dado a conocer, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales que contienen un péptido de fusión intacto, tal como un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal en el que ninguno de los aminoácidos de las posiciones 137-154 se sustituyen o se delecionan. En otro ejemplo del método, se proporcionan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales que contienen un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido de ectodominio de
10 proteína F de VRS no escindido C-terminal en el que aproximadamente los aminoácidos 137-152, aproximadamente los aminoácidos 137-153, aproximadamente los aminoácidos 137-145 o aproximadamente los aminoácidos 137-142 se delecionan. También se han descrito otras delecciones de péptidos de fusión adecuadas, tales como la delección de los aminoácidos en las posiciones 137-146. Ruiz-Arguello *et al.*, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004).

15 En algunas realizaciones, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados se purifican. Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos proporcionados se escinden, y la escisión da como resultado la formación de trímeros de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos. Si se desea, los trímeros pueden purificarse usando además cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión molecular.

20 En ejemplos particulares del método dado a conocer, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados contienen al menos el polipéptido de furina N-terminal (figura 1). Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales proporcionados se escinden, por ejemplo con tripsina, y la escisión da como resultado la formación de trímeros escindidos, rosetas de trímeros
25 escindidos o una combinación de trímeros escindidos y rosetas de trímeros escindidos de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS. Si se desea, los trímeros escindidos y/o rosetas de trímeros escindidos pueden purificarse además usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión molecular.

Otro método de este aspecto de la divulgación incluye: a) proporcionar un material biológico, tal como un lisado celular, homogeneizado celular o medio acondicionado de cultivo celular, que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales que comprenden un sitio de escisión de furina alterado en la posición 136/137, y dichos polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS solubles se secretan de una célula que los produce en forma de un fragmento F₂ que está asociado con una subunidad que comprende F₁ pero no está escindido en la posición 136/137, con la condición de que el sitio de escisión de furina alterado no sea la delección de aminoácidos
30 131-134; y b) purificar los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales del material biológico, produciendo de ese modo la composición. Preferiblemente, el extremo amino terminal de la subunidad F₁ es de desde aproximadamente la posición 110 hasta aproximadamente la posición 132. Más preferiblemente, el extremo amino terminal de la subunidad F₁ es aproximadamente la posición 110. Se prefiere particularmente que el extremo amino terminal de la subunidad F₁ no sea la posición 137. En ejemplos particulares, el material biológico que
35 contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales incluye al menos el polipéptido de furina N-terminal.

Si se desea, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindido C-terminal contiene además sitios alterados o delecionados para otras proteasas (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la
40 posición 101 y aproximadamente la posición 161 para impedir la escisión por proteasa (por ejemplo, tripsina). Por ejemplo, uno o más residuos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los residuos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se delecionan o se reemplazan por un aminoácido que no es lisina ni arginina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales no se escinden por la tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161.
45 Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales pueden contener un péptido de fusión intacto o un péptido de fusión alterado, tal como se describe en el presente documento.

Los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales, por ejemplo, trímeros pueden purificarse hasta el grado deseado. Se prefiere generalmente que los trímeros de polipéptido de ectodominio de
50 proteína F de VRS no escindidos C-terminales se purifiquen, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o sustancialmente homogéneos. Tal como se describe en el presente documento, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales pueden purificarse fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular. Por consiguiente,
55 el método dado a conocer puede usarse para producir fácilmente una composición que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales, por ejemplo, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros, que están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas. En ejemplos particulares del método, los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales contienen al menos el polipéptido de furina N-terminal (figura 1).
60

En un ejemplo, el método incluye proporcionar medio acondicionado para cultivo de células de insecto, medio

acondicionado para cultivo de células de mamífero, medio acondicionado para células de ave, medio acondicionado para células de levadura, medio acondicionado para células de *Tetrahymena* o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, se purifican trímeros de polipéptido de ectodominio de la proteína F de VRS no escindidos C-terminales.

5

La composición inmunogénica

La divulgación proporciona composiciones inmunogénicas. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir un solo agente inmunogénico activo, o varios agentes inmunogénicos. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede comprender polipéptidos F de VRS que están en una sola forma (por ejemplo, trímero o rosetas) o en dos o más formas (por ejemplo, una mezcla de monómero y trímero o un equilibrio dinámico entre monómero y trímero). La composición inmunogénica puede comprender un ARN autorreplicante que codifica un polipéptido F de VRS, y preferiblemente también comprende un sistema de administración adecuado, tal como liposomas, micropartículas poliméricas, una emulsión de aceite en agua y combinaciones de los mismos.

15

Las composiciones inmunogénicas pueden comprender también uno o más agentes inmunorreguladores. Preferiblemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes, por ejemplo dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, comentados adicionalmente a continuación.

20

En otra realización, una composición inmunogénica comprende un polipéptido que muestra un epítipo presente en una conformación de prefusión o intermedia de la glucoproteína VRS-F, pero no presenta la conformación de posfusión de la glucoproteína.

25

Se da a conocer una composición inmunogénica que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en la que el primer polipéptido comprende una proteína F de VRS, en su totalidad o en parte, y el segundo polipéptido comprende un dominio de oligomerización heterólogo. El primer polipéptido puede comprender un ectodominio de proteína F de VRS. El segundo polipéptido puede ser un dominio de trimerización.

30

En un aspecto, se da a conocer una composición que comprende polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos producidos proporcionando polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, o polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales, y escindiéndolos para producir subunidades F₁ y F₂, tal como se describe en el presente documento.

35

En otro aspecto, se da a conocer una composición que comprende trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, y purificando los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, trímeros no escindidos o una combinación de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos (por ejemplo, una mezcla o un equilibrio dinámico) del material biológico, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS contiene sitios de escisión de furina alterados en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136, y si se desea puede contener además un péptido de fusión alterado. En otras realizaciones, el ectodominio de proteína F de VRS contiene sitios de escisión de furina alterados en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136, y sitios de escisión de tripsina alterados entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y si se desea puede contener además un péptido de fusión alterado.

45

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos C-terminales, y purificando polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos, trímeros no escindidos del material biológico, tal como se describe en el presente documento.

50

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos producidos proporcionando un material biológico que contiene polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS escindidos que contienen un péptido de fusión alterado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión se deletorea) y purificando trímeros de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS escindidos del material biológico, tal como se describe en el presente documento.

55

Las composiciones son preferiblemente adecuadas para su administración a un sujeto mamífero, tal como un ser humano, e incluyen uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo adyuvantes. En la referencia 29 está disponible una discusión detallada de tales componentes. Las composiciones estarán generalmente en forma acuosa. Cuando la composición es una composición inmunogénica, provocará una respuesta inmunitaria cuando se administra a un mamífero, tal como un ser humano. La composición inmunogénica puede usarse para preparar una formulación de vacuna para inmunizar a un mamífero.

65

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir un solo agente inmunogénico activo, o varios agentes

inmunogénicos. Por ejemplo, el polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS puede estar en una sola forma (por ejemplo, trímero no escindido, trímero escindido o rosetas de trímeros escindidos) o en dos o más formas. Además, las composiciones pueden contener un polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS y una o más de otras proteínas de VRS (por ejemplo, una proteína G y/o una proteína M) y/o puede combinarse con inmunógenos de otros patógenos.

La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5 µg/ml) material de mercurio, por ejemplo, libre de tiomersal. Se prefieren más composiciones inmunogénicas que no contienen mercurio. Se prefieren particularmente composiciones inmunogénicas libres de conservantes.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de disodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y similares.

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y se encontrarán más preferiblemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM. El pH de una composición estará generalmente 5,0 y 8,1, y más normalmente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Por tanto, un procedimiento puede incluir una etapa de ajuste del pH de la vacuna a granel antes de su envasado.

La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferiblemente no pirógena conteniendo, por ejemplo, <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferiblemente <0,1 UE por dosis. La composición está preferiblemente libre de gluten. Las vacunas humanas se administran normalmente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse la mitad de la dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a los niños.

Adyuvantes

Las composiciones de la invención, que contienen polipéptidos VRS-F, también pueden incluir uno o más adyuvantes, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más adyuvantes, que pueden funcionar potenciando las respuestas inmunitarias (humoral y/o celular) provocadas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2. Los adyuvantes que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Composiciones que contienen minerales. Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas). Esto incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc., o mezclas de diferentes compuestos minerales, adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción. Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" dadas a conocer en la referencia 38). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos y similares. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal de metal (39). Se describen adyuvantes de sal de aluminio con más detalle a continuación.
- Composiciones de emulsión de aceite (véase con más detalle a continuación). Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (el 5% de escualeno, el 0,5% de Tween 80 y el 0,5% de Span, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador).
- Agentes inductores de citocinas (véase con más detalle a continuación). Los agentes inductores de citocinas adecuados para su uso en la invención incluyen agonistas del receptor 7 de tipo Toll (TLR7) (por ejemplo, compuestos de benzonafiridina dados a conocer en el documento WO 2009/111337).
- Saponinas (capítulo 22 de la referencia 74), que son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies de plantas. Se ha estudiado ampliamente la saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina como coadyuvante. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones de

adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como STIMULON (TM). Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. En la referencia 40 se describe un método de producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide, tal como colesterol (41). Pueden usarse combinaciones de saponinas y esteroides para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (capítulo 23 de la referencia 74). Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede usarse en ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las referencias 41-43. Opcionalmente, los ISCOM puede estar desprovisto de detergente adicional (44). En las referencias 45 y 46 puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes a base de saponina.

- Adyuvantes grasos (véase con más detalle a continuación), incluyendo emulsiones de aceite en agua, lípidos A naturales modificados derivados de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos de fosfolípidos (tales como el dímero de fosfolípido sintético, E6020) y similares.

- Toxinas bacterianas ADP-ribosilantes (por ejemplo, la enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT", toxina del cólera "CT" o toxina de la tosferina "PT") y derivados detoxificados de las mismas, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 (47). En la referencia 48 se describe el uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como adyuvantes mucosos y como adyuvantes parenterales en la referencia 49.

- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado (50) o quitosano y sus derivados (51).

- Micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferiblemente de ~200 nm a ~30 µm de diámetro o de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un poli(ácido hidroxibutírico), un poliortéster, un polianhídrido, una policaprolactona, y similares), prefiriéndose la poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

- Liposomas (capítulos 13 y 14 de la referencia 74). En las referencias 52-54 se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes.

- Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (55). Tales formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol (56) así como tensioactivos de ésteres o éteres de polioxietilentalquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (57). Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: lauril éter de polioxietilen-9 (lauril éter 9), esteoril éter de polioxietilen-9, esteoril éter de polioxietilen-8, lauril éter de polioxietilen-4, lauril éter de polioxietilen-35 y lauril éter de polioxietilen-23.

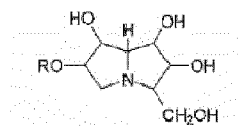
- Péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida ("DTP-DPP" o Theramide™), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").

- Una preparación de proteosoma de proteína de la membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacárido derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en donde las preparaciones de proteosoma de proteína de la membrana externa y de liposacárido forman un complejo adyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo compuesto por lipopolisacáridos y membrana externa de *Neisseria meningitidis*.

- Un polímero de polioxidonio (58, 59) u otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidada.

- 5'-Monofosfato de metilinosina ("MIMP") (60).

- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxada (61), como el que tiene la fórmula:



donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, o una de sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-di*epi*-casuarina y similares.

- Un ligando de CD1d, tal como una α -glicosilceramida (62-69) (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.

- Una inulina gamma (70) o un derivado de la misma, tal como algamulina.

- Virosomas y partículas similares a virus (VLP). Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus combinadas o formuladas opcionalmente con un fosfolípido. Generalmente no son patógenas, no se replican y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse o aislarse de manera recombinante a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus influenza (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o de la cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la fiebre aftosa, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 de retrotransposón Ty).

Estas y otras sustancias activas adyuvantes se comentan en más detalle en las referencias 74 y 75.

Las composiciones pueden incluir dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden incluir ventajosamente tanto una emulsión de aceite en agua como un agente inductor de citocinas, o tanto una composición que contiene minerales como un agente inductor de citocinas, o dos adyuvantes de emulsión de aceite en agua, o dos compuestos de benzonaftiridinas, etc.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán normalmente en mezcla.

Adyuvantes de emulsión de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (el 5 % de escualeno, el 0,5 % de Tween 80 y el 0,5 % de Span 85, formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidizador). También pueden usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Se conocen diversas emulsiones de aceite en agua, y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el(los) aceite(s) y el(los) tensioactivo(s) biodegradable(s) (metabolizable(s)) y biocompatible(s). Las gotitas de aceite en la emulsión generalmente tienen menos de 5 μ m de diámetro, y pueden incluso tener un diámetro submicrométrico, lográndose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño menor de 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La invención puede usarse con aceites como los una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y cereales. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, el más comúnmente disponible, ejemplifican los aceites de frutos secos. Puede usarse aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de cereales, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Pueden prepararse ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen de manera natural en los aceites de semillas, por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamíferos son metabolizables y, por tanto, pueden usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena

tal como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse en el presente documento. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y generalmente se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado y ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que se prefiere particularmente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase a continuación). Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su 'HLB' (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15 y más preferiblemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (comúnmente denominados Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), comercializados con el nombre comercial DOWFAX (TM), tales como copolímeros de bloque de EO/PO lineales; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) de repetición, siendo de particular interés octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie TERGITOL (TM) NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como monolauril éter de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren tensioactivos no iónicos. Tensioactivos preferidos para su inclusión en la emulsión son TWEEN 80 (TM) (monooleato de polioxietilensorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de TWEEN 80 (TM)/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitán tal como monooleato de polioxietilensorbitán (TWEEN 80 (TM)) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauril éter 9 más un éster de polioxietilensorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilensorbitán (tales como TWEEN 80 (TM)) del 0,01 al 1%, en particular aproximadamente el 0,1%; octil- o nonilfenoxipolioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como lauril éter 9) del 0,1 al 20 %, preferiblemente del 0,1 al 10 % y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente el 0,5 %.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, TWEEN 80 (TM) y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas razones se convierten en el 4,3 % de escualeno, el 0,5% de polisorbato 80 y el 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' (71-73), como se describe con más detalle en el capítulo 10 de la referencia 74 y el capítulo 12 de la referencia 75. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones de citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y TWEEN 80 (TM). La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de desde el 2 hasta el 10 % de escualeno, desde el 2 hasta el 10 % de tocoferol y desde el 0,3 hasta el 3 % de TWEEN 80 (TM), y la razón en peso de escualeno: tocoferol es preferiblemente <1 ya que proporciona una emulsión más estable. Pueden estar presentes escualeno y TWEEN 80 (TM) en una razón en volumen de aproximadamente 5:2. Puede prepararse una emulsión de este tipo disolviendo TWEEN 80 (TM) en PBS para dar una disolución al 2 %, luego mezclando 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocopherol y 5 ml de escualeno) y luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente 180 nm aproximadamente.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión puede contener un tampón fosfato.

- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocopherol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una razón en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, polisorbato 80 750 μ g/ml, Triton X-100 110 μ g/ml y succinato de α -tocopherol 100 μ g/ml), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes procedente de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un

tampón fosfato.

- 5 • Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("PLURONIC (TM) L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (76) (el 0,05-1 % de Thr-MDP, el 5 % de escualano, el 2,5 % de Pluronic L121 y el 0,2 % de polisorbato 80). También puede usarse sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" (77) (el 5% de escualano, el 1,25% de Pluronic L121 y el 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.
- 10 • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de alquil éter de polioxietileno (por ejemplo, cetostearyl éter de polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monoleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos el 90% de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño menor de 200 nm. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglucósido. Tales emulsiones pueden liofilizarse.
- 15 • Una emulsión que tiene desde el 0,5 hasta el 50 % de un aceite, el 0,1-10 % de un fosfolípido y el 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Tal como se describe en la referencia 78, componentes de fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos tamaños de gotita submicrométricos.
- 20 • Una emulsión de aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, TWEEN 80 (TM) o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 79, producido mediante la adición de una amina alifática a desacilsaponina por medio del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.
- 25 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno).
- 30 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno).
- 35 • Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroide (por ejemplo, un colesterol) se asocian como micelas helicoidales (80).
- 40

Las emulsiones pueden mezclarse con el antígeno de manera extemporánea, en el momento de la administración. Por tanto, el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para la formulación final en el momento de su uso. El antígeno estará generalmente en forma acuosa, de manera que finalmente la vacuna se prepara mezclando dos líquidos. La razón en volumen de los dos líquidos para mezclar puede 45 variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5), pero generalmente es de 1:1 aproximadamente.

Agentes inductores de citocinas

- 50 Los agentes inductores de citocinas para su inclusión en las composiciones de la invención son capaces de, cuando se administran a un paciente, provocar que el sistema inmunitario libere citocinas, incluyendo interferones e interleucinas. Los agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón- γ ; interleucina-1; interleucina-2; interleucina-12; TNF- α ; TNF- β ; y GM-CSF. Los agentes preferidos provocan la liberación de citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo Th1, por ejemplo, interferón- γ , TNF- α , interleucina-2. Se prefiere la estimulación tanto de interferón- γ como de interleucina-2.
- 55

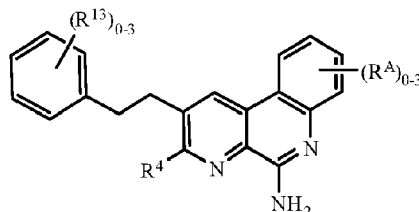
Como resultado de recibir una composición de la invención, por tanto, un paciente tendrá células T que, cuando se estimulan con una proteína F de VRS, liberarán la(s) citocina(s) deseada(s) de una manera específica de antígeno. Por ejemplo, las células T purificadas de su sangre liberarán interferón γ cuando se exponen *in vitro* a la proteína F. En la técnica se conocen métodos para medir tales respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR en tiempo real. Por ejemplo, la referencia 81 notifica un estudio en el que se monitorizaron las respuestas inmunitarias mediadas por células T específicas de antígeno contra el toxoide tetánico, específicamente respuestas de interferón γ , y se encontró que ELISPOT era el método más sensible para discriminar las respuestas inducidas por TT específicas de antígeno de las respuestas espontáneas, pero que la

5 detección de citocinas intracitoplasmáticas por citometría de flujo era el método más eficiente para detectar efectos reestimulantes.

Los agentes inductores de citocinas adecuados incluyen, pero no se limitan a:

- 10 • Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene una citosina no metilada unida mediante un enlace fosfato a una guanosina), o un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia de poli(dG).
- 15 • monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3dMPL', también conocido como 'MPL (TM)') (82-85).
- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como IMIQUIMOD (TM) ("R-837") (86, 87), RESIQUIMOD (TM) ("R-848") (88), y sus análogos; y sales del mismo (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Pueden encontrarse detalles adicionales sobre imidazoquinolinas inmunoestimuladoras en las referencias 89 a 93.
- 20 • Un compuesto de benzonafitridina, tal como: (a) un compuesto que tiene la fórmula:



25 en la que:

R⁴ se selecciona de H, halógeno, -C(O)OR⁷, -C(O)R⁷, -C(O)N(R¹¹R¹²), -N(R¹¹R¹²), -N(R⁹)₂, -NHN(R⁹)₂, -SR⁷, -(CH₂)_nOR⁷, -(CH₂)_nR⁷, -LR⁸, -LR¹⁰, -OLR⁸, -OLR¹⁰, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxilo C₁-C₆, haloalcoxilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈ y heterocicloalquilo C₃-C₈, en el que los grupos alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxilo C₁-C₆, haloalcoxilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈ y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁴ están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -CN, -NO₂, -R⁷, -OR⁸, -C(O)R⁸, -OC(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -N(R⁹)₂, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -C(O)N(R⁹)₂, -S(O)₂R⁸, -S(O)R⁸, -S(O)₂N(R⁹)₂ y -NR⁹S(O)₂R⁸;

cada L se selecciona independientemente de un enlace, -(O(CH₂)_m)_t, alquilo C₁-C₆, alquilenilo C₂-C₆ y alquinileno C₂-C₆, en el que el alquilo C₁-C₆, alquilenilo C₂-C₆ y alquinileno C₂-C₆ de L están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -R⁸, -OR⁸, -N(R⁹)₂, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂ y -OP(O)(OR¹⁰)₂;

R⁷ se selecciona de H, alquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxilo C₁-C₆, haloalcoxilo C₁-C₆ y heterocicloalquilo C₃-C₈, en el que los grupos alquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxilo C₁-C₆, haloalcoxilo C₁-C₆ y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁷ están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos R¹³;

cada R⁸ se selecciona independientemente de H, -CH(R¹⁰)₂, alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, haloalquilo C₁-C₆, alcoxilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₂-C₈, hidroxialquilo C₁-C₆ y haloalcoxilo C₁-C₆, en el que los grupos alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₂-C₈, hidroxialquilo C₁-C₆ y haloalcoxilo C₁-C₆ de R⁸ están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de -CN, R¹¹, -OR¹¹, -SR¹¹, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)N(R⁹)₂, -C(O)OR¹¹, -NR⁹C(O)R¹¹, -NR⁹R¹⁰, -NR¹¹R¹², -N(R⁹)₂, -OR⁹, -OR¹⁰, -C(O)NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹OH, -S(O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, -S(O)₂NR¹¹R¹², -NR¹¹S(O)₂R¹¹, -P(O)(OR¹¹)₂ y -OP(O)(OR¹¹)₂;

cada R⁹ se selecciona independientemente de H, -C(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -C(O)R¹⁰, -C(O)OR¹⁰, -S(O)₂R¹⁰, -alquil C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₃-C₆, o cada R⁹ es independientemente un alquilo C₁-C₆ que junto con el N al que están unidos forman un heterocicloalquilo C₃-C₈, en el que el anillo de heterocicloalquilo C₃-

C₈ contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S, y en el que los grupos alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆ o heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁹ están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de -CN, R¹¹, -OR¹¹, -SR¹¹, -C(O)R¹¹, -OC(O)R¹¹, -C(O)OR¹¹, -NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹R¹², -C(O)NR¹¹OH, -S(O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, -S(O)₂NR¹¹R¹², -NR¹¹S(O)₂R¹¹, -P(O)(OR¹¹)₂ y -OP(O)(OR¹¹)₂;

cada R¹⁰ se selecciona independientemente de arilo, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈ y heteroarilo, en el que los grupos arilo, cicloalquilo C₃-C₈, heterocicloalquilo C₃-C₈ y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halógeno, -R⁸, -OR⁸, -LR⁹, -LOR⁹, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹CO₂R⁸, -CO₂R⁸, -C(O)R⁸ y -C(O)N(R⁹)₂;

R¹¹ y R¹² se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈ y heterocicloalquilo C₃-C₈, en los que los grupos alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈ y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R¹¹ y R¹² están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -CN, R⁸, -OR⁸, -C(O)R⁸, OC(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -N(R⁹)₂, -NR⁸C(O)R⁸, -NR⁸C(O)OR⁸, -C(O)N(R⁹)₂, heterocicloalquilo C₃-C₈, -S(O)₂R⁸, -S(O)₂N(R⁹)₂, -NR⁹S(O)₂R⁸, haloalquilo C₁-C₆ y haloalcoxilo C₁-C₆;

o R¹¹ y R¹² son cada uno independientemente alquilo C₁-C₆ y tomados junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de heterocicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S;

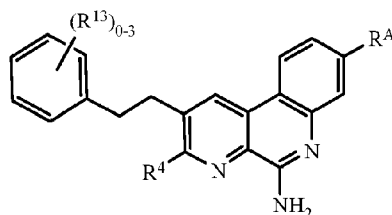
cada R¹³ se selecciona independientemente de halógeno, -CN, -LR⁹, -LOR⁹, -OLR⁹, -LR¹⁰, -LOR¹⁰, -OLR¹⁰, -LR⁸, -LOR⁸, -OLR⁸, -LSR⁸, -LSR¹⁰, -LC(O)R⁸, -OLC(O)R⁸, -LC(O)OR⁸, -LC(O)R¹⁰, -LOC(O)OR⁸, -LC(O)NR⁹R¹¹, -LC(O)NR⁹R⁸, -LN(R⁹)₂, -LNR⁹R⁸, -LNR⁹R¹⁰, -LC(O)N(R⁹)₂, -LS(O)₂R⁸, -LS(O)R⁸, -LC(O)NR⁸OH, -LNR⁹C(O)R⁸, -LNR⁹C(O)OR⁸, -LS(O)₂N(R⁹)₂, -OLS(O)₂N(R⁹)₂, -LNR⁹S(O)₂R⁸, -LC(O)NR⁹LN(R⁹)₂, -LP(O)(OR⁸)₂, -LOP(O)(OR⁸)₂, -LP(O)(OR¹⁰)₂ y -OLP(O)(OR¹⁰)₂;

cada R^A se selecciona independientemente de -R⁸, -R⁷, -OR⁷, -OR⁸, -R¹⁰, -OR¹⁰, -SR⁸, -NO₂, -CN, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹C(S)R⁸, -NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹C(S)N(R⁹)₂, -NR⁹CO₂R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹NR⁹CO₂R⁸, -C(O)C(O)R⁸, -C(O)CH₂C(O)R⁸, -CO₂R⁸, -(CH₂)_nCO₂R⁸, -C(O)R⁸, -C(S)R⁸, -C(O)N(R⁹)₂, -C(S)N(R⁹)₂, -OC(O)N(R⁹)₂, -OC(O)R⁸, -C(O)N(OR⁸)R⁸, -C(NOR⁸)R⁸, -S(O)₂R⁸, -S(O)₃R⁸, -SO₂N(R⁹)₂, -S(O)R⁸, -NR⁹SO₂N(R⁹)₂, -NR⁹SO₂R⁸, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -N(OR⁸)R⁸, -CH=CHCO₂R⁸, -C(=NH)-N(R⁹)₂ y -(CH₂)_nNHC(O)R⁸; o dos sustituyentes R^A adyacentes en el anillo A forman un anillo de 5-6 miembros que contiene hasta dos heteroátomos como miembros de anillo;

n es, independientemente en cada caso, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; (b) a compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

R⁴ se selecciona de H, halógeno, -C(O)OR⁷, -C(O)R⁷, -C(O)N(R¹¹R¹²), -N(R¹¹R¹²), -N(R⁹)₂, -NHN(R⁹)₂, -SR⁷, -(CH₂)_nOR⁷, -(CH₂)_nR⁷, -LR⁸, -LR¹⁰, -OLR⁸, -OLR¹⁰, alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxilo C₁-C₆, haloalcoxilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈ y heterocicloalquilo C₃-C₈, en el que los grupos alquilo C₁-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, alcoxilo C₁-C₆, haloalcoxilo C₁-C₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃-C₈ y heterocicloalquilo C₃-C₈ de R⁴ están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -CN, -NO₂, -R⁷, -OR⁸, -C(O)R⁸, -OC(O)R⁸, -C(O)OR⁸, -N(R⁹)₂, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -C(O)N(R⁹)₂, -S(O)₂R⁸, -S(O)R⁸, -S(O)₂N(R⁹)₂ y -NR⁹S(O)₂R⁸;

cada L se selecciona independientemente de un enlace, -(O(CH₂)_m)_t, alquilo C₁-C₆, alquilenilo C₂-C₆ y alquinilenilo C₂-C₆, en el que el alquilo C₁-C₆, alquilenilo C₂-C₆ y alquinilenilo C₂-C₆ de L están cada uno

opcionalmente sustituidos con de 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, $-R^8$, $-OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$ y $-OP(O)(OR^{10})_2$;

R^7 se selecciona de H, alquilo C_1-C_6 , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , alcoxilo C_1-C_6 , haloalcoxilo C_1-C_6 y heterocicloalquilo C_3-C_8 , en el que los grupos alquilo C_1-C_6 , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , alcoxilo C_1-C_6 , haloalcoxilo C_1-C_6 y heterocicloalquilo C_3-C_8 de R^7 están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 grupos R^{13} ;

cada R^8 se selecciona independientemente de H, $-CH(R^{10})_2$, alquilo C_1-C_8 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , haloalquilo C_1-C_6 , alcoxilo C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , heterocicloalquilo C_2-C_8 , hidroxialquilo C_1-C_6 y haloalcoxilo C_1-C_6 , en el que los grupos alquilo C_1-C_8 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , alcoxilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , heterocicloalquilo C_2-C_8 , hidroxialquilo C_1-C_6 y haloalcoxilo C_1-C_6 de R^8 están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^9C(O)R^{11}$, $-NR^9R^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-N(R^9)_2$, $-OR^9$, $-OR^{10}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$ y $-OP(O)(OR^{11})_2$;

cada R^9 se selecciona independientemente de H, $-C(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-alquil C_1-C_6$, heteroalquilo C_1-C_6 y cicloalquilo C_3-C_6 , o cada R^9 es independientemente un alquilo C_1-C_6 que junto con el N al que están unidos forman un heterocicloalquilo C_3-C_8 , en el que el anillo de heterocicloalquilo C_3-C_8 contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S, y en el que los grupos alquilo C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 o heterocicloalquilo C_3-C_8 de R^9 están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$ y $-OP(O)(OR^{11})_2$;

cada R^{10} se selecciona independientemente de arilo, cicloalquilo C_3-C_8 , heterocicloalquilo C_3-C_8 y heteroarilo, en el que los grupos arilo, cicloalquilo C_3-C_8 , heterocicloalquilo C_3-C_8 y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halógeno, $-R^8$, $-OR^8$, $-LR^9$, $-LOR^9$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9CO_2R^8$, $-CO_2R^8$, $-C(O)R^8$ y $-C(O)N(R^9)_2$;

R^{11} y R^{12} se seleccionan independientemente de H, alquilo C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 y heterocicloalquilo C_3-C_8 , en los que los grupos alquilo C_1-C_6 , heteroalquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_3-C_8 y heterocicloalquilo C_3-C_8 de R^{11} y R^{12} están cada uno opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, $-CN$, R^8 , $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-NR^8C(O)R^8$, $-NR^8C(O)OR^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, heterocicloalquilo C_3-C_8 , $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$, $-NR^9S(O)_2R^8$, haloalquilo C_1-C_6 y haloalcoxilo C_1-C_6 ;

o R^{11} y R^{12} son cada uno independientemente alquilo C_1-C_6 y tomados junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de heterocicloalquilo C_3-C_8 opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S;

cada R^{13} se selecciona independientemente de halógeno, $-CN$, $-LR^9$, $-LOR^9$, $-OLR^9$, $-LR^{10}$, $-LOR^{10}$, $-OLR^{10}$, $-LR^8$, $-LOR^8$, $-OLR^8$, $-LSR^8$, $-LSR^{10}$, $-LC(O)R^8$, $-OLC(O)R^8$, $-LC(O)OR^8$, $-LC(O)R^{10}$, $-LOC(O)OR^8$, $-LC(O)NR^9R^{11}$, $-LC(O)NR^9R^8$, $-LN(R^9)_2$, $-LNR^9R^8$, $-LNR^9R^{10}$, $-LC(O)N(R^9)_2$, $-LS(O)_2R^8$, $-LS(O)R^8$, $-LC(O)NR^9OH$, $-LNR^9C(O)R^8$, $-LNR^9C(O)OR^8$, $-LS(O)_2N(R^9)_2$, $-OLS(O)_2N(R^9)_2$, $-LNR^9S(O)_2R^8$, $-LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, $-LP(O)(OR^8)_2$, $-LOP(O)(OR^8)_2$, $-LP(O)(OR^{10})_2$ y $-OLP(O)(OR^{10})_2$;

cada R^A se selecciona independientemente de $-R^8$, $-R^7$, $-OR^7$, $-OR^8$, $-R^{10}$, $-OR^{10}$, $-SR^8$, $-NO_2$, $-CN$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9C(S)R^8$, $-NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9C(S)N(R^9)_2$, $-NR^9CO_2R^8$, $-NR^9NR^9C(O)R^8$, $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9NR^9CO_2R^8$, $-C(O)C(O)R^8$, $-C(O)CH_2C(O)R^8$, $-CO_2R^8$, $-(CH_2)_nCO_2R^8$, $-C(O)R^8$, $-C(S)R^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(S)N(R^9)_2$, $-OC(O)N(R^9)_2$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)N(OR^8)R^8$, $-C(NOR^8)R^8$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_3R^8$, $-SO_2N(R^9)_2$, $-S(O)R^8$, $-NR^9SO_2N(R^9)_2$, $-NR^9SO_2R^8$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$ y $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$;

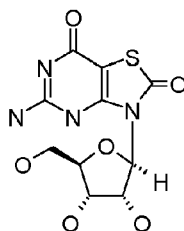
n es, independientemente en cada caso, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

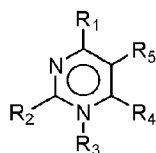
t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; o (c) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) o (b). Se describen otros compuestos de benzonafiridina, y métodos de preparación de compuestos de benzonafiridina, en el documento WO 2009/111337. Un compuesto de benzonafiridina, o una sal del mismo, puede usarse por sí mismo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, puede usarse un compuesto de benzonafiridina en combinación con una emulsión de aceite en agua o una composición que contiene minerales. En una realización particular, se usa un compuesto de benzonafiridina en combinación con una

emulsión de aceite en agua (por ejemplo una emulsión de escualeno-agua, tal como MF59) o una composición que contiene minerales (por ejemplo, una sal mineral tal como una sal de aluminio o una sal de calcio).

- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los dados a conocer en la referencia 94. También se describen métodos de formulación, fabricación y cribado para compuestos activos en la referencia 94. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como $\text{TNF-}\alpha$.
- Un compuesto de triptantrina, tal como los dados a conocer en la referencia 95. También se describen métodos de formulación, fabricación y cribado en la referencia 95. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como $\text{TNF-}\alpha$.
- Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos dados a conocer en las referencias 96 a 98; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

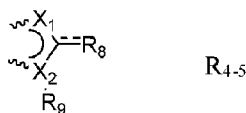


en la que:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente H, halo, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{OH}$, alcoxilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido;

R_3 está ausente, H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

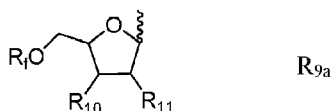
R_4 y R_5 son cada uno independientemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_d$, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, o se unen entre sí para formar un anillo de 5 miembros como en R_{4-5} :



lográndose la unión en los enlaces indicados por un \sim , X_1 y X_2 son cada uno independientemente N, C, O o S;

R_8 es H, halo, $-\text{OH}$, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , alqueno C_{2-6} , $-\text{OH}$, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{R}_c$, $-\text{O}-(\text{alquilo } \text{C}_{1-6})$, $-\text{S}(\text{O})_p\text{R}_e$ o $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_d$;

R_9 es H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a} , en el que R_{9a} es:



lográndose la unión en el enlace indicado por un \sim , R_{10} y R_{11} son cada uno independientemente H, halo, alcoxilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} sustituido, $-\text{NR}_a\text{R}_b$ u $-\text{OH}$;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀;

cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido;

cada R_d es independientemente H, halo, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alcoxilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆ sustituido, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -NH(alquilo C₁₋₆ sustituido), -N(alquilo C₁₋₆)₂, -N(alquilo C₁₋₆ sustituido)₂, arilo C₆₋₁₀ o heterociclilo;

cada R_e es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, fosfato, difosfato o trifosfato;

cada n es independientemente 0, 1, 2 o 3;

cada p es independientemente 0, 1 o 2; o

o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f) o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (99).
- Compuestos dados a conocer en la referencia 100, incluyendo: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoleidona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazolquinolinona (ABIQ) (101, 102), compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de colesterol, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol (103), compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol (104).

- Compuestos dados a conocer en la referencia 105.

- Un derivado fosfato de aminoalquilglucosaminida, tal como RC-529 (106, 107).

- Un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") tal como se describe, por ejemplo, en las referencias 108 y 109.

- Inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP) tales como:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina

1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol

acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo

4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

5 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

10 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

1-[4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

15 N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina.

Los agentes inductores de citocinas para su uso en la presente invención pueden ser moduladores y/o agonistas de receptores de tipo Toll (TLR). Por ejemplo, pueden ser agonistas de una o más de las proteínas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9 humanas. Agentes preferidos son agonistas de TLR4 (por ejemplo, lípidos A naturales modificados derivados de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos de fosfolípidos, tales como el dímero de fosfolípido sintético, E6020), TLR7 (por ejemplo, benzonafitridinas, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos CpG). Estos agentes son útiles para activar rutas de inmunidad innata.

El agente inductor de citocinas puede añadirse a la composición en diversas fases durante su producción. Por ejemplo, puede estar dentro de una composición de antígeno, y esta mezcla puede añadirse entonces a una emulsión de aceite en agua. Como alternativa, puede estar dentro de una emulsión de aceite en agua, en cuyo caso el agente puede añadirse a los componentes de la emulsión antes de la emulsificación o puede añadirse a la emulsión después de la emulsificación. De manera similar, el agente puede coacervarse dentro de las gotitas de la emulsión. La ubicación y distribución del agente inductor de citocinas dentro de la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, por ejemplo, el agente puede estar ubicado en la fase acuosa, en la fase oleosa y/o en la interfase aceite-agua.

El agente inductor de citocinas puede conjugarse con un agente separado, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). En la referencia 110 se proporciona una revisión general de técnicas de conjugación para moléculas pequeñas. Como alternativa, los adyuvantes pueden asociarse de manera no covalente con agentes adicionales, por ejemplo por medio de interacciones hidrófobas o iónicas.

Agentes inductores de citocinas preferidos son (a) compuestos de benzonatridina; (b) oligonucleótidos inmunoestimuladores y (c) 3dMPL.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (excepto para el ARN) monocatenarios. Las referencias 111, 112 y 113 dan a conocer posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, el reemplazo de guanosina por 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se comenta adicionalmente en las referencias 114 a 119. Una secuencia CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT (120). La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN CpG-A (oligodesoxinucleótido), o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se comentan en las referencias 121-123. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 120 y 124-126. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como PROMUNE (TM) (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

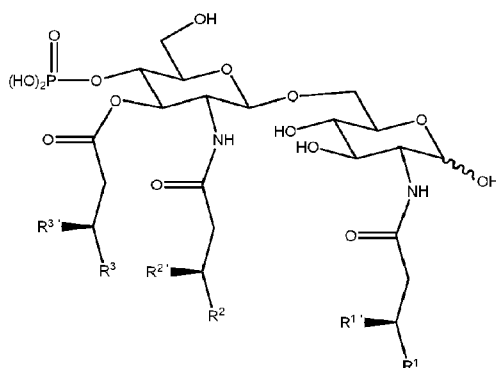
Como alternativa, o además, al uso de secuencias CpG, pueden usarse secuencias TpG (127). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados.

El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, tal como se da a conocer en la referencia 127), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de timidina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, tal como se da a conocer en la referencia 127), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de citosina (por ejemplo, >35 %, >40 %, >50 %, >60 %, >80 %, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán normalmente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

3dMPL (también conocido como monofosforil lípido A 3 des-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) es un adyuvante en el que se ha desacilado la posición 3 del extremo reductor de la glucosamina en el monofosforil lípido A. Se ha preparado 3dMPL a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a base. Activa células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF (véase también la referencia 128). La preparación de 3dMPL se describió originalmente en la referencia 129.

3dMPL puede adoptar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varían en su acilación (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5 o 6 cadenas de acilo, que pueden tener diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocida como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en sus carbonos de posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2'), y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo unido al carbono 2 tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR¹R¹. El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR²R². El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula -O-CO-CH₂-CR³R³. Una estructura representativa es:



Los grupos R¹, R² y R³ son cada uno independientemente -(CH₂)_n-CH₃. El valor de *n* es preferiblemente de entre 8 y 16, más preferiblemente entre 9 y 12, y es lo más preferiblemente 10.

Los grupos R¹, R² y R³ pueden ser cada uno independientemente: (a) -H; (b) -OH; o (c) -O-CO-R⁴, donde R⁴ es o bien -H o bien -(CH₂)_m-CH₃, en el que el valor de *m* es preferiblemente de entre 8 y 16, y es más preferiblemente 10, 12 o 14. En la posición 2, *m* es preferiblemente 14. En la posición 2', *m* es preferiblemente 10. En la posición 3', *m* es preferiblemente 12. Los grupos R¹, R² y R³ son por tanto preferiblemente grupos -O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos de R¹, R² y R³ son -H, entonces el 3dMPL tiene solo 3 cadenas de acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando solo dos de R¹, R² y R³ son -H, entonces el 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Cuando solo uno de R¹, R² y R³ es -H, entonces el 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Cuando ninguno de R¹, R² y R³ es -H, entonces el 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante 3dMPL usado según la invención puede ser una mezcla de estas formas, con desde 3 hasta 6 cadenas de acilo, pero se prefiere que incluya 3dMPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla, y en particular para garantizar que la forma de cadena de hexaacilo constituya al menos el 10 % en peso del 3dMPL total, por ejemplo, >20 %, >30 %, >40 %, >50 % o más. Se ha encontrado que 3dMPL con 6 cadenas de acilo es la forma más activa como adyuvante.

Por tanto, la forma más preferida de 3dMPL para su inclusión en composiciones de la invención tiene la fórmula (IV), mostrada a continuación.

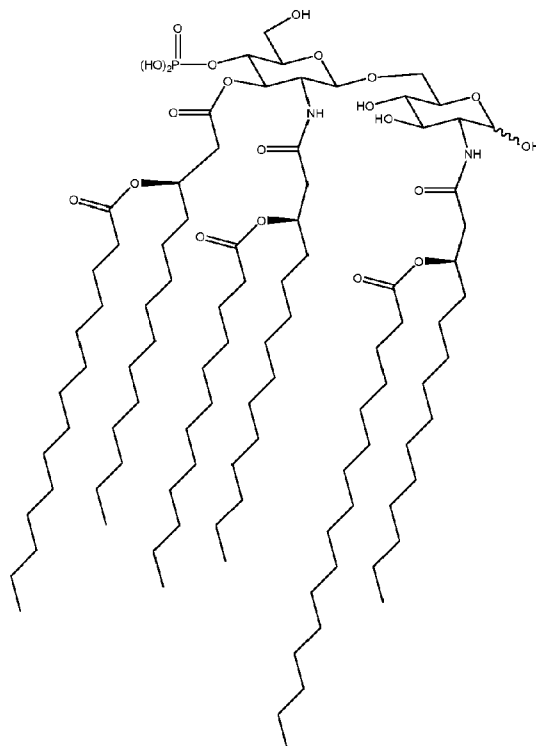
Cuando se usa 3dMPL en forma de una mezcla, entonces las referencias a cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a las especies de 3dMPL combinadas en la mezcla.

En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro <150 nm o >500 nm. Cualquiera o ambos de estos pueden usarse con la invención, y pueden seleccionarse las mejores partículas mediante un ensayo de rutina. Se prefieren partículas más pequeñas (por ejemplo, lo suficientemente pequeñas como para dar una suspensión acuosa transparente de 3dMPL) para su uso debido a su actividad superior (130). Las partículas preferidas tienen un diámetro medio menor de 220 nm, más preferiblemente menor de 200 nm o menor de 150 nm o menor de 120 nm, y pueden tener incluso un diámetro medio menor de 100 nm. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el diámetro medio no será inferior a 50 nm. Estas partículas son lo suficientemente pequeñas como para ser adecuadas para la esterilización por filtración. El diámetro de partícula puede evaluarse mediante la técnica de rutina de dispersión dinámica de la luz, que revela un diámetro de partícula medio. Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de *x* nm, habrá generalmente una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50 % en número (por ejemplo, >60 %, >70 %, >80 %, >90 %, o más) de las partículas tendrán un diámetro dentro del intervalo *x*+25 %.

3dMPL puede usarse ventajosamente en combinación con una emulsión de aceite en agua. Sustancialmente la

totalidad del 3dMPL puede estar ubicado en la fase acuosa de la emulsión.

El 3dMPL puede usarse por sí mismo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se conoce el uso de 3dMPL en combinación con la saponina QS21 (131) (incluyendo en una emulsión de aceite en agua (132)), con un oligonucleótido inmunoestimulador, con tanto QS21 como un oligonucleótido inmunoestimulador, con fosfato de aluminio (133), con hidróxido de aluminio (134) o con tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio.

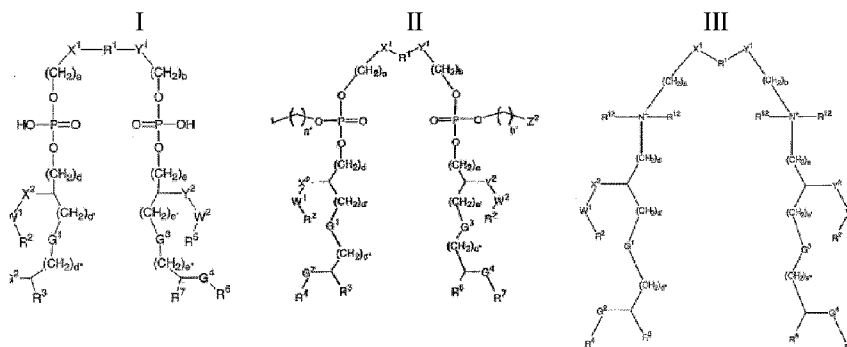


Fórmula (IV)

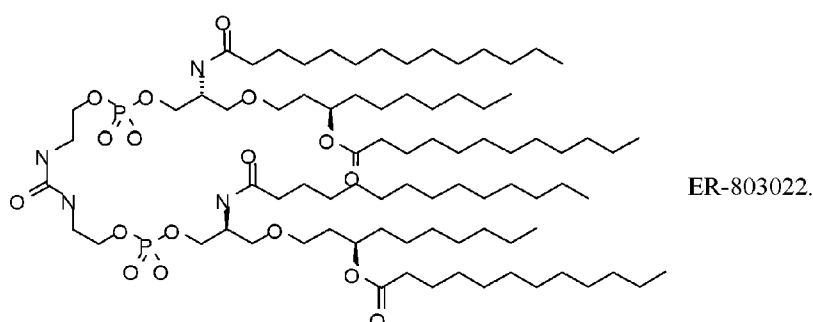
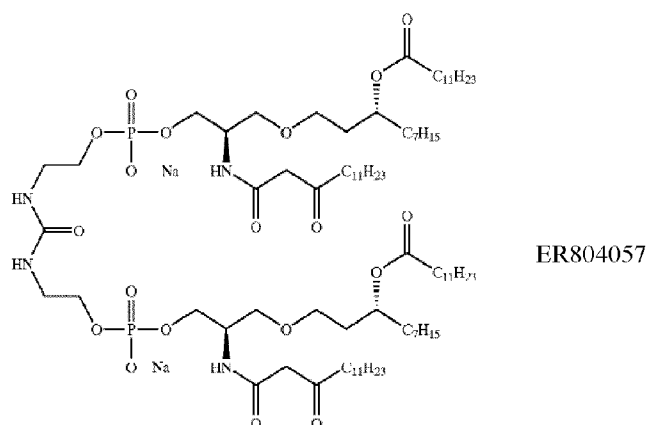
10 Adyuvantes grasos

Los adyuvantes grasos que pueden usarse con la invención incluyen las emulsiones de aceite en agua descritas anteriormente, y también incluyen, por ejemplo:

- 15 • Un compuesto de fosfolípido de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:

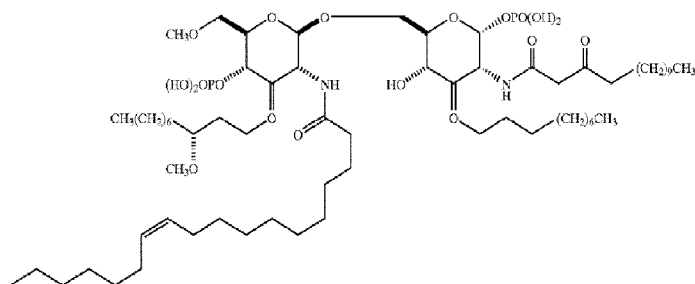


tal como se define en la referencia 135, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022' o 'ER 804057', por ejemplo:

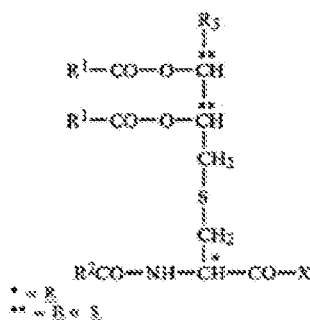


ER804057 también se denomina E6020. Un compuesto de fosfolípido de fórmula I, II o III, o una sal del mismo, puede usarse por sí mismo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, un compuesto de fórmula I, II o III, puede usarse en combinación con una emulsión de aceite en agua o una composición que contiene minerales. En una realización particular, se usa E6020 en combinación con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno-agua, tal como MF59) o una composición que contiene minerales (por ejemplo, una sal mineral tal como una sal de aluminio o una sal de calcio).

- Derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174 (descrito en las referencias 136 y 137).
- Una formulación de un lípido catiónico y un colípido (habitualmente neutro), tal como bromuro de aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("VAXFECTIN (TM)") o bromuro de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeceneiloxi)-1-propanaminio (138).
- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado (véase anteriormente).
- Compuestos que contienen lípidos unidos a una estructura principal acíclica que contiene fosfato, tal como el antagonista de TLR4 E5564 (139, 140):



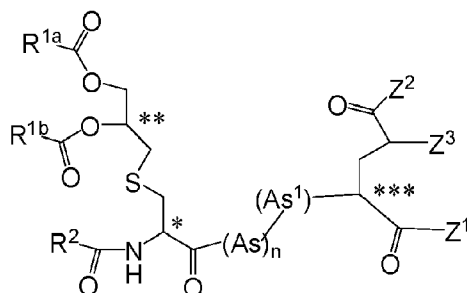
- Lipopéptidos (es decir, compuestos que comprenden uno o más residuos de ácido graso y dos o más residuos de aminoácido), tales como lipopéptidos basados en glicerilcisteína. Los ejemplos específicos de tales péptidos incluyen compuestos de la siguiente fórmula



en la que cada uno de R¹ y R² representa un radical hidrocarburo saturado o insaturado, alifático o alifático-cicloalifático mixto que tiene desde 8 hasta 30, preferiblemente de 11 a 21, átomos de carbono que está también opcionalmente sustituido con funciones oxígeno, R³ representa hidrógeno o el radical R¹-CO-O-CH₂- en el que R¹ tiene el mismo significado que anteriormente, y X representa un aminoácido unido mediante una unión peptídica y que tiene un grupo carboxilo libre, esterificado o amidado, o una secuencia de aminoácidos de desde 2 hasta 10 aminoácidos de los cuales el grupo carboxilo terminal está en forma libre, esterificada o amidada. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende un D-aminoácido, por ejemplo, ácido D-glutámico (D-Glu) o ácido D-gamma-carboxi-glutámico (D-Gla).

Los lipopéptidos bacterianos reconocen generalmente TLR2, sin requerir la participación de TLR6. (Los TLR funcionan cooperativamente proporcionando reconocimiento específico de diversos desencadenantes, y TLR2 más TLR6 reconocen juntos peptidoglucanos, mientras que TLR2 reconoce lipopéptidos sin TLR6). Estos se clasifican algunas veces como lipopéptidos naturales y lipopéptidos sintéticos. Los lipopéptidos sintéticos tienden a comportarse de manera similar, y se reconocen principalmente por TLR2.

Los lipopéptidos adecuados para su uso como adyuvantes incluyen compuestos que tienen la fórmula:



donde el centro quiral marcado * y el marcado *** están ambos en la configuración R;

el centro quiral marcado ** está o bien en la configuración R o bien en la S;

cada R^{1a} y R^{1b} es independientemente un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático-alifático que tiene 7-21 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con funciones oxígeno, o uno de R^{1a} y R^{1b}, pero no ambos, es H;

R² es un grupo hidrocarburo alifático o cicloalifático que tiene 1-21 átomos de carbono y opcionalmente sustituido con funciones oxígeno;

n es 0 o 1;

As representa o bien -O-Kw-CO- o bien -NH-Kw-CO-, donde Kw es un grupo hidrocarburo alifático que tiene 1-12 átomos de carbono;

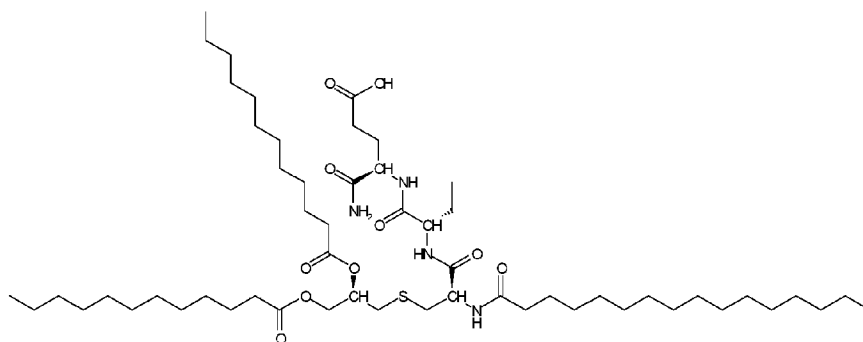
As¹ es un D- o L-alfa-aminoácido;

Z¹ y Z² representan cada uno independientemente -OH o el radical N-terminal de un D- o L-alfa-aminoácido de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados de los ácidos D- y L-alfa-aminocarboxílicos y ácidos amino-alquilo inferior-sulfónicos; y

Z³ es H o -CO-Z⁴, donde Z⁴ es -OH o el radical N-terminal de un D- o L-alfa-aminoácido de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados de los ácidos D y L-alfa-aminocarboxílicos y ácidos amino-alquilo inferior-sulfónicos; o un éster o una amida formado a partir del ácido carboxílico de tales compuestos. Las amidas adecuadas incluyen -NH₂ y NH(alquilo inferior), y los ésteres adecuados

incluyen ésteres alquílicos C1-C4. (Alquilo inferior o alcano inferior, tal como se usa en el presente documento, se refiere a alquilos ramificados o de cadena lineal C₁-C₆).

Tales compuestos se describen en más detalle en el documento US 4.666.886. En una realización particular, el lipopéptido tiene la fórmula:



Otro ejemplo de una especie de lipopéptido se denomina LP40, y es un agonista de TLR2. Akdis, *et al.*, Eur. J. Immunology, 33: 2717-26 (2003).

Estos están relacionados con una clase conocida de lipopéptidos de *E. coli*, denominados lipoproteínas de mureína. Ciertos productos de degradación parcial de esas proteínas denominadas lipopéptidos de mureína se describen en Hantke, *et al.*, Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973). Estos comprenden un péptido unido a ácido N-acetilmurámico y, por tanto, están relacionados con los péptidos de muramilo, que se describen en Baschang, *et al.*, Tetrahedron, 45(20): 6331-6360 (1989).

Adyuvantes de sales de aluminio

Pueden usarse los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" y "fosfato de aluminio". Estos nombres son convencionales, pero se usan por conveniencia solo, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 74). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son normalmente sales de oxihidróxido de aluminio, que habitualmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse mediante la fórmula $AlO(OH)$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, por espectroscopia infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un hombro fuerte a $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de la referencia 74). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a la mitad de la altura (WHH), mostrando partículas poco cristalinas un mayor ensanchamiento de la línea debido a los tamaños de unidades cristalinas más pequeños. El área de superficie aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha observado que los adyuvantes con valores de WHH más altos tienen una mayor capacidad de adsorción de antígenos. Una morfología fibrosa (por ejemplo, tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pI de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es normalmente de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga de superficie positiva a pH fisiológico. Se han notificado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son normalmente hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del hidroxilo por fosfato en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una razón molar de PO_4/Al de entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del $AlPO_4$ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta hasta $200\text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 74).

La razón molar de PO_4/Al^{3+} de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente entre 0,3 y 1,2, preferiblemente entre 0,8 y 1,2, y más preferiblemente 0,95+0,1. El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una razón molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio generalmente estará particulado (por ejemplo, morfología de placa tal como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de $0,5\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ (por ejemplo, aproximadamente $5\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han notificado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

- El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución del hidroxilo por fosfato, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de los reactivos usados para preparar la sal mediante precipitación. El PZC también se altera al cambiar la concentración de iones de fosfato libres en la disolución (más fosfato = PZC más ácido) o al añadir un tampón, tal como un tampón histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados tendrán generalmente un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,7.
- Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar las composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato o histidina o Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferiblemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir iones de fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración de entre 1,0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 15 mM, y más preferiblemente 10 mM aproximadamente. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.
- La invención puede usar una mezcla de tanto un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una razón en peso de al menos 2:1, por ejemplo, >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.
- La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferiblemente menor de 10 mg/ml, por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg/dosis.
- Además de incluir uno o más adyuvantes de sal de aluminio, el componente adyuvante puede incluir uno o más agentes inmunoestimulantes o adyuvantes adicionales. Tales componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a: un compuesto de benzonafiridina, un adyuvante de monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3d-MPL'); y/o una emulsión de aceite en agua. 3d-MPL también se denomina monofosforil lípido A 3 des-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A. El nombre indica que la posición 3 del extremo reductor de la glucosamina en monofosforil lípido A está desacilada. Se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *S. minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a base. Activar células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF. La preparación de 3d-MPL se describió originalmente en la referencia 129, y el producto lo ha fabricado y comercializado Corixa Corporation con el nombre MPL (TM). Pueden encontrarse detalles adicionales en las referencias 82 a 85.
- El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio es útil, particularmente en niños, y generalmente se adsorben antígenos a estas sales. También se prefieren emulsiones de escualeno en agua, particularmente en los ancianos. Las combinaciones de adyuvantes útiles incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2 tales como CpG y alumbre, o resiquimod y alumbre. Puede usarse una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL. Otras combinaciones que pueden usarse incluyen: alumbre y un compuesto de benzonafiridina o SMIP, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59) y un compuesto de benzonafiridina o SMIP, y E6020 y una emulsión de escualeno en agua, tal como MF59) o alumbre.
- Las composiciones de la invención pueden generar tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral.
- Generalmente, se cree que dos tipos de células T, células CD4 y CD8, son necesarias para iniciar y/o potenciar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Las células T CD8 pueden expresar un correceptor CD8 y se denominan comúnmente linfocitos T citotóxicos (CTL). Las células T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en las moléculas del MHC de clase I.
- Las células T CD4 pueden expresar un correceptor CD4 y se denominan comúnmente células T auxiliares. Las células T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC de clase II. Tras la interacción con una molécula del MHC de clase II, las células CD4 pueden secretar factores tales como citocinas. Estas citocinas secretadas pueden activar células B, células T citotóxicas, macrófagos y otras células que participan en una respuesta inmunitaria. Las células T auxiliares o las células CD4+ pueden dividir además en dos subconjuntos funcionalmente distintos: fenotipo TH1 y fenotipos TH2 que difieren en su función efectora y de citocinas.
- Las células TH1 activadas potencian la inmunidad celular (incluyendo un aumento en la producción de CTL específicos de antígeno) y, por tanto, son de particular valor para responder a infecciones intracelulares. Las células TH1 activadas pueden secretar uno o más de IL-2, IFN- γ y TNF- β . Una respuesta inmunitaria TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales mediante la activación de macrófagos, células NK (citotóxicas naturales) y células T citotóxicas (CTL) CD8. Una respuesta inmunitaria TH1 también puede actuar expandiendo la respuesta inmunitaria al estimular el crecimiento de células B y T con IL-12. Las células B estimuladas por TH1 pueden secretar IgG2a.
- Las células TH2 activadas potencian la producción de anticuerpos y, por tanto, son valiosas para responder a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas pueden secretar uno o más de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Una respuesta inmunitaria TH2 puede dar como resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria para

una protección futura.

Una respuesta inmunitaria potenciada puede incluir una o más de una respuesta inmunitaria TH1 y una respuesta inmunitaria TH2 potenciadas.

Una respuesta inmunitaria TH1 puede incluir uno o más de un aumento en CTL, un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria TH1 (tales como IL-2, IFN- γ y TNF- β), un aumento en macrófagos activados, un aumento en la actividad NK o un aumento en la producción de IgG2a. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria TH1 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG2a.

Puede generarse una respuesta inmunitaria TH1 usando un adyuvante TH1. Un adyuvante TH1 generará en general niveles aumentados de producción de IgG2a en relación con la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH1 adecuados para su uso en la invención pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de saponina, virosomas y partículas similares a virus, derivados no tóxicos de lipopolisacárido (LPS) enterobacteriano, oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, son adyuvantes TH1 preferidos para su uso en la invención.

Una respuesta inmunitaria TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria TH2 (tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria TH2 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG1.

Puede generarse una respuesta inmunitaria TH2 usando un adyuvante TH2. Un adyuvante TH2 generará en general niveles aumentados de producción de IgG1 en relación con la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH2 adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones oleosas y toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas. Las composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio, son adyuvantes TH2 preferidos para su uso en la invención.

Una composición puede incluir una combinación de un adyuvante TH1 y un adyuvante TH2. Preferiblemente, una composición de este tipo genera una respuesta TH1 potenciada y una TH2 potenciada, es decir, un aumento en la producción tanto de IgG1 como de IgG2a en relación con la inmunización sin adyuvante. Todavía más preferiblemente, la composición que comprende una combinación de un adyuvante TH1 y uno TH2 genera una respuesta inmunitaria TH1 aumentada y/o TH2 aumentada en relación con la inmunización con un solo adyuvante (es decir, en relación con la inmunización con un adyuvante TH1 solo o la inmunización con un adyuvante TH2 solo).

La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria TH1 y una respuesta TH2. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria proporciona una o ambas de una respuesta TH1 potenciada y una respuesta TH2 potenciada.

La respuesta inmunitaria potenciada puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica y una mucosa. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria proporciona una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica potenciada y una respuesta inmunitaria mucosa potenciada. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria mucosa es una respuesta inmunitaria TH2. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

Métodos de tratamiento y administración

Las composiciones de la invención son adecuadas para su administración a mamíferos, y la invención proporciona un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende la etapa de administrar una composición (por ejemplo, una composición inmunogénica) de la invención al mamífero. Las composiciones (por ejemplo, una composición inmunogénica) puede usarse para producir una formulación de vacuna para inmunizar a un mamífero. El mamífero es normalmente un ser humano, y el ectodominio de proteína F de VRS es un ectodominio de proteína F de VRS humano. Sin embargo, el mamífero puede ser cualquier otro mamífero que sea susceptible a la infección con VRS, tal como una vaca que puede infectarse con VRS bovino. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede generarse tras la administración de una proteína F de VRS purificada, una partícula de alfavirus o ARN autorreplicante.

La invención proporciona una composición de la invención para su uso como medicamento, por ejemplo, para su uso en la inmunización de un paciente contra la infección con VRS.

La respuesta inmunitaria generada mediante estos métodos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectora. En la técnica se conocen bien métodos para evaluar respuestas de anticuerpos tras la vacunación contra VRS.

Pueden administrarse composiciones de la invención de varios modos adecuados, tales como inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), inyección subcutánea, administración intranasal, administración oral,

administración intradérmica, administración transcutánea, administración transdérmica, y similares. La vía de administración apropiada dependerá de la edad, la salud y otras características del mamífero. Un médico será capaz de determinar una vía de administración apropiada basándose en estos y otros factores.

- 5 Pueden usarse composiciones inmunogénicas y formulaciones de vacuna para tratar tanto a niños como a adultos, incluyendo mujeres embarazadas. Por tanto, un sujeto puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Sujetos preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, >50 años de edad, >60 años de edad y preferiblemente >65 años), los jóvenes (por ejemplo, <6 años de edad, tal como 4 - 6 años de edad, <5 años de edad) y las mujeres embarazadas. Las vacunas no son
10 adecuadas únicamente para estos grupos, sin embargo, y pueden usarse más generalmente en una población.

- El tratamiento puede ser mediante un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma vía o vías diferentes, por ejemplo, una sensibilización parenteral y un refuerzo mucoso, una sensibilización mucosa y un refuerzo parenteral, etc. La
15 administración de más de una dosis (normalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente no expuestos previamente. Normalmente, se administran múltiples dosis con al menos 1 semana de separación (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12
20 semanas, aproximadamente 16 semanas, y similares).

- Las formulaciones de vacuna producidas usando una composición de la invención pueden administrarse a los pacientes a sustancialmente el mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional sanitario o centro de vacunación) otras vacunas.

- 25 La invención también proporciona una composición que comprende moléculas que comprenden ectodominios de glucoproteína F de VRS, en la que los ectodominios de al menos el 50 % (por ejemplo, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 %) de las moléculas están presentes en una conformación de prefusión.

30 **Polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS**

- Se usan polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS particulares o se incluyen en algunas realizaciones de la invención. Algunos de los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS particulares contienen secuencias de aminoácidos alteradas desde aproximadamente la posición 100 hasta aproximadamente la posición 161. Las
35 secuencias de aminoácidos desde la posición 100 hasta la posición 150 para varios polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS particulares se muestran en la figura 1C. Las secuencias de aminoácidos de varios polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS particulares se presentan en el presente documento, por ejemplo, en el ejemplo 1.

40 **General**

- El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste" y "que consiste esencialmente en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

- 45 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

- El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

- 50 A menos que se establezca específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

- 55 Cuando se usan materiales animales (y en particular bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). Globalmente, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

- 60 Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede reemplazarse alternativamente por un profármaco adecuado.

- 65 Cuando se usa un sustrato celular para procedimientos de reordenamiento o de genética inversa, es preferible uno que se haya aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en la farmacopea europea, capítulo general 5.2.3.

La identidad entre secuencias de polipéptido se determina preferiblemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman tal como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de huecos afines con los parámetros penalización por apertura de hueco=12 y penalización por extensión de hueco=1.

5

Tabla 1. Fosfolípidos

10

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DEPG	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DLPG	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DLPS	1,2-Dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DMPG	1,2-Miristoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DMPS	1,2-Estoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DOPS	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DPPG	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DPPS	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPyPE	1,2-Diftanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPA	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfato
DSPC	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DSPG	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol...)]
DSPS	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
EPC	PC de huevo
HEPC	PC de huevo hidrogenada
HSPC	PC de soja hidrogenada de alta pureza
HSPC	PC de soja hidrogenada
LYSOPC MIRÍSTICA	1-Miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC PALMÍTICA	1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
LYSOPC ESTEÁRICA	1-Estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
MPPC de esfingomielina de leche	1-Miristoil,2-palmitoil-sn-glicero 3-fosfatidilcolina

MSPC	1-Miristoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PMPC	1-Palmitoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPC	1-Palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3[fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]
PSPC	1-Palmitoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SMPC	1-Estearoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SOPC	1-Estearoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
SPPC	1-Estearoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

EJEMPLIFICACIÓN

Ejemplo 1 - Polipéptidos F de VRS

5 Este ejemplo proporciona secuencias de varios ejemplos de polipéptidos (por ejemplo, que contienen secuencias señal) y secuencias de ácido nucleico que pueden usarse para expresar polipéptidos F de VRS. Las secuencias de aminoácidos presentadas incluyen el péptido señal y contienen un ligador C-terminal y una etiqueta His opcionales (GGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO: 90)). Cuando se producen estos polipéptidos en células huésped, la célula
10 procesará habitualmente el polipéptido para eliminar el péptido señal y, tal como se describe en el presente documento, algunos de los polipéptidos se escindirán, por ejemplo en sitios de escisión de furina no modificados. Las composiciones pueden contener todas las formas de los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS particulares dados a conocer en el presente documento, incluyendo formas maduras, que carecen del péptido señal, formas que pueden escindirse en subunidades que comprenden F₁ y F₂, y formas que carecen de la etiqueta His C-terminal
15 opcional. Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos del alcance de la presente invención y por tanto no pretenden limitar el alcance de ningún modo.

Un ejemplo de escisión con furina de tipo natural es F de VRS de tipo natural truncado HIS (SEQ ID NO: 84).

20 Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse como monómeros incluyen: F de VRS Furx (SEQ ID NO: 45); F de VRS antiguo furx truncado HIS (SEQ ID NO: 88); F de VRS Furx R113Q K123N K124N truncado HIS (SEQ ID NO: 89); F de VRS delp21 furx truncado HIS (SEQ ID NO: 47); y F de VRS F delP23 furx truncado HIS (SEQ ID NO: 48).

25 Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse como trímeros incluyen: F de VRS furina N-term truncado HIS (SEQ ID NO: 85); F de VRS delección de fusión truncado HIS (SEQ ID NO: 67); y F de VRS delección de fusión 2 truncado HIS (SEQ ID NO: 68).

30 Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse como monómeros o rosetas de trímeros incluyen: F de VRS furmt truncado HIS (SEQ ID NO: 50); F de VRS furdel truncado HIS (SEQ ID NO: 51); F de VRS delP21 furdel truncado HIS (SEQ ID NO: 86); y F de VRS delP23 furdel truncado HIS (SEQ ID NO: 49), y F de VRS factor Xa truncado HIS (SEQ ID NO: 52).

35 Un ejemplo de una escisión de tipo natural que produce probablemente una formación de roseta es F de VRS furina C-term truncado HIS (SEQ ID NO: 87).

Completo

El siguiente polipéptido es un polipéptido F de VRS de longitud completa.

```

1  MELLILKANA  ITTILTAVTTF  CFASGQNITE  EFYQSTCSAV  SKGYLSALRT  GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN  GTDAKVLIK  QELDKYNAV  TELQLLMQST  PATNNRARRE  LPRFMNYTLN
121  NAKKTNVTLS  KKRKRREFLG  LLGVGSAIAS  GVAVSKVLHL  EGEVKNKISA  LLSTNKAVVS
181  LSNVSVLTS  KVLDLKNYID  KQLLPVKNQ  SCSISNIETV  IEFQQKNRNL  LEITREFSVN
241  AGVTTPVSTY  MLTNSELLSL  INDMPTNDQ  KKLSNNVQI  VRQQSYSIMS  IIKEEVLAYV
301  VQLPLYGVID  TPCWKLHTSP  LCTTNTKEGS  NICLTRTRDG  WYCDNAGSVS  FFPQAETCKV
361  QSNRVFCDTM  NSLTLPSEVN  LCNVDIFNPK  YDCKIMTSKT  DVSSSVITSL  GAIVSCYGKT
421  KCTASNKNRG  IIKTFSNGCD  YVSNKGVDTV  SVGNTLYYVN  KQEGKSLYVK  GEPIINFYDP
481  LVFPSEFEDA  SISQVNEKIN  QSLAFIRKSD  ELLHNVNAGK  STTNIMITTI  IIVIIVILLS
541  LIAVGLLLYC  KARSTPVTLS  KDQLSGINNI  AFSN  (SEQ ID NO: 21)

```

40

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
5 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCTGCCCCC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACTGAAG (SEQ ID NO: 22)

```

HIS completo

- 10 El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de VRS de longitud completa seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CPASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNQSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQQNNRL LEITREFSVN
241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLS INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLTSP LCTTNTKEGS NICLRTDRG WYCDNAGSVS FFPQATCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNSGGSAG SGHHHHHH (SEQ ID NO: 23)

```

- 15 La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CTTGCGGACC GGC'TGGTACA CCAGCGTGA' CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAAC TA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCTTGCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGACCCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGAGGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGCAAG
1561 AGCACCAACA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCTGA TCATTGTGAT CCTGTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCGGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACAGCGGCGG CAGCGCGGCG
1741 TCTGGCCACC ACCACCATCA CCACTGAAG (SEQ ID NO: 24)

```

5 pre HIS completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de VRS de longitud completa con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) unido al extremo C-terminal del polipéptido F de VRS seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1 MELLILKANA ITTILTAFTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIENPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GALVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSEFEDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLN KDQLSGINNI AFSNGSSGRM KQIEDKIEEL LSKYHIEEN
601 IARIKKLIGE SGGSAGSGHH HHHH (SEQ ID NO: 25)

```

10

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGA CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAAC TAACCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCAATGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCTGTCTC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCCGGATG
1741 AAGCAGATCG AGGACAAGAT CGAGGAAATC CTGAGCAAGA TCTACCACAT CGAGAACGAG
1801 ATCGCCCGGA TCAAGAAGCT GATCGGCGAA AGCGCGGGCT CTGCCGGAAG CGGCCACCAC
1861 CACCATCACC ACTGAAG (SEQ ID NO: 26)

```

pre HIS completo 2

- 5 El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de VRS de longitud completa con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) unido al extremo C-terminal del polipéptido F de VRS seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRLGFL LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIEKEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSFVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSXT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSGNCD YVSNKGVDIV SVGNLTYYVN KQEGKSLEYK GEPIINFYDP
481 LVFSPDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGSG RMKQIEDKIE EILSKIYHIE
601 NEIARIKKLI GESGGSAGSG HHHHHH (SEQ ID NO: 27)

```

- 10 La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAG AGAATCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCAATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCAATGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCGCA GCACCCCTGT GACCCGTGTC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAGCGGC
1741 CGGATGAAGC AGATCGAGGA CAAGATCGAG GAAATCCTGA GCAAGATCTA CCACATCGAG
1801 AACGAGATCG CCCGGATCAA GAAGCTGATC GCGGAAAGCG GCGGCTCTGC CGGAAGCGGC
1861 CACCACCACC ATCACCCTG AAG (SEQ ID NO: 28)

```

5

ecto HIS

El siguiente polipéptido incluye el ectodominio del polipéptido F de VRS seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRLGFL LIGVGSIAIS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNQSVSLTS KVLDLKNYID KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN
241 AGVTFPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAECKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPEVN LCNVDIFENPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG LKTFENGCY YVSNKGVDTV SVGNTRYLVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSEFEDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNSGG SAGSGHHHHH H

```

(SEQ ID NO: 29)

10

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1  ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61  TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT' ACCTGAGCGC CTTGCGGACC GGC'TGGTACA CCAGCGT'GAI' CACCAT'CGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAAC TA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCTTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCAACG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT' GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACAC'GTA' C'ACG'TGAAT'
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGAGGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TAGCGGCGGC
1561 AGCGCCGGCT CTGGCCACCA CCACCATCAC CACTGAAG (SEQ ID NO: 30)

```

5 ecto pre HIS

El siguiente polipéptido incluye el ectodominio del polipéptido F de VRS con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) insertado en el polipéptido F de VRS en el sentido de 5' de donde habría estado el dominio TM de la proteína de VRS (que comienza en el a. a. 517) seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1  MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRI GWYTSVITIE
61  LSNIKENKCN GTDAVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKK'INVTL' KRRKRR'LG' LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLS'NKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQNNRL LEITREFSVN
241 AGVTFPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLEYK GEPIINFYDP
481 LVFSPDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNDXI EEILSKIYHI ENEIARIKKL
541 IGESGGSAGS GHHHHHH (SEQ ID NO: 31)

```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.


```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAG AGAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACCTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTCTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGACAAGATC
1561 GAGGAAATCC TGAGCAAGAT CTACCACATC GAGAACGAGA TCGCCCGGAT CAAGAAGCTG
1621 ATCGGCGAAA GCGGCGGCTC TGCCGGAAGC GGCCACCACC ACCATCACCA CTGAAG
(SEQ ID NO: 32)

```

pre HA HIS completo

- 5 El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de VRS de longitud completa con el dominio de trimerización de posfusión del polipéptido de hemaglutinina de influenza (subrayado) unido al extremo C-terminal del polipéptido F de VRS seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSXVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQOKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVLD TPCWKLHTSP LC'T'NT'KEGS NICL'T'RT'DRG WYCDNAGSVS FEPQAE'CKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSXT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYLYVN KQEGKSPLYV GEPIINFYDP
481 LVFPSEDFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGNE KFHQIEKEFS EVEGRIQDLE
601 KSGGSAGSGH HHHHH (SEQ ID NO: 33)

```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACCT CACCTGGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACCTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCAACG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGCGCT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGCGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGTCTCTT
1621 CTGATTGCCG TGGGCTTGT GCTGTACTGC AAGGCCGCA GCACCCCTGT GACCTGTTC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAATGAG
1741 AAGTTCCACC AGATCGAGAA AGAATTCAGC GAGGTGGAGG GCCGGATCCA GGACCTGGAA
1801 AAGAGCGGCG GCTCTGCCCG AAGCGGCCAC CACCACCATC ACCACTGAAG
(SEQ ID NO: 34)

```

5 ecto pre HA HIS

El siguiente polipéptido incluye el ectodominio del polipéptido F de VRS con el dominio de trimerización de posfusión del polipéptido de hemaglutinina de influenza (subrayado) insertado en el polipéptido F de VRS en el sentido de 5' de donde habría estado del dominio TM de la proteína de VRS (que comienza en el a.a. 517) seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN
241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIEKEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSXT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNEXF HQIEKEFSEV EGRIQDLEKS
541 GGSAGSGHHH HHH (SEQ ID NO: 35)

```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido

anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGAATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGG GAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGCGGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCGAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCTTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGAGAAGTTC
1561 CACCAGATCG AGAAAGAATT CAGCGAGGTG GAGGGCCGGA TCCAGGACCT GGAAAAGAGC

1621 GGCGGCTCTG CCGGAAGCGG CCACCACCAC CATCACCCT GAAG (SEQ ID NO: 36)

```

5

ΔHRB HIS completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de VRS de longitud completa con el dominio HRB delecionado seguido por una etiqueta de hexa-histidina.

10

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDXYKNAV TELQLMQST PATNNRARE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLCLKNYID KQLLPVKNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRL LEITREFSVN
241 AGVTFPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVLD TPCWKLHTSP LCTTNTEKES NICLPTDRG WYCDNAGSVS FFPQAE'CKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASKNKRG IIKTFNGCD YVSNXGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPNIMITTI
481 IIVIIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPVTLN KDQLSGINNI AFSNMGGSHH HHHH
(SEQ ID NO: 37)

```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

15

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT' TCA'TGAAC'TA CACCT'GAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCTTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CTGGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGT'GA CCACCCCGT' GAGCACCT'AC AT'GCT'GACCA ACAGCGAGCT' GCT'GT'CCCT'G
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCAACG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGAGCCCA ATATCATGAT CACCACAATC
1441 ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGTGTCT CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC
1501 AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCTGTCTC AAGGACCAGC TGTCCGCGAT CAACAATATC
1561 GCCTTCTCCA ACATGGGGGG TTCTCATCAT CATCATCATC ATTGAAG
(SEQ ID NO: 38)

```

5 ecto

El siguiente polipéptido incluye tan solo el ectodominio del polipéptido F de VRS.

```

1 MELLILKANA ITTILTAFTF CFASQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KRRKRR'LG' LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLS'NKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNYID KQLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIEKEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSXT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTN (SEQ ID NO: 39)

```

10

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificante optimizada para la secuencia de polipéptido anterior.

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCT'GAI' GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAAC TA CACCT'GAAC

```

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCCTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATTGAAG (SEQ ID NO: 40)

F de VRS de longitud completa

5

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPREFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRLGF
 LLGVGSAIASGVAVSVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
 SCSISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT?CWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSXTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 KCTASNKNRGIKTF?SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLS
 KDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 41)

Enterocinasa de escisión de F de VRS idealizada

10

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPREFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRLGF
 LLGVGSAIASGVAVSVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
 SCSISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT?CWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSXTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 KCTASNKNRGIKTF?SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
 SISQINEKINQILAFIRKIDELHNNINAGKSTTNGSGSGDDDDDKGSGSGIMITTIIIVIIIVILLSLIAV
 GLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 42)

Trombina de escisión de F de VRS idealizada

15

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPFRMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGALVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGLVPRGSGSGIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGL
LLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO:43)

Factor Xa de escisión de F de VRS idealizado

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPFRMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGALVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGLEGSGSGIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGL
LLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO:44)

5

F de VRS furx truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSQNQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGALVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKIDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:45)

10

F de VRS furx R113Q, K123N, K124N truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNANNTNVTLSSQNQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGALVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKIDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:46)

15

F de VRS furx R113Q, K123Q, K124Q truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAQQTNVTLSSQNQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGALVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKIDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:93)

F de VRS delP21 furx truncado HIS

```

MELLILKANAIITITLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALPTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATRNQAQN-----
QNNQNFPLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLDLKKNYID
KQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQ
KELMENNVOIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGW
WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
IYVSCYGKTKCTASNNKRGIIKTFENGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
LVPSEDFEASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO: 47)

```

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)

5 F de VRS delP23 furx truncado HIS

```

MELLILKANAIITITLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALPTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATRNQAQN-----
QNNQNFPLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLDLKKNYIDKQ
LLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK
LMSNNVOIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWY
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
IYVSCYGKTKCTASNNKRGIIKTFENGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
LVPSEDFEASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO: 48)

```

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)

F de VRS delP23 furdel truncado HIS

```

MELLILKANAIITITLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALPTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATRNRAQ-----
QQQRFPLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLDLKKNYIDKQ
LLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK
LMSNNVOIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWY
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
IYVSCYGKTKCTASNNKRGIIKTFENGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
LVPSEDFEASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO: 49)

```

10 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)

F de VRS furmt truncado HIS

```

MELLILKANAIITITLTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKKKFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLDLKKNYIDKQLLPIVVKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVOI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNNKRGIIKTFENGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVLPSEDFE
ASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO: 50)

```

F de VRS furdel truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GELAKVKLEKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSEK-----
BFLSGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNEIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSEKVLDLKNYIDKQLLP
IVNKGSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMS
NNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTFCWKLHTSPLCCTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
AGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
CYGKTKCTASNKNGRIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SEFDASIBQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:51)

F de VRS factor Xa truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSEKIEGRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNEIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSEKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTFCWKLHTSPLCCTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNGRIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:52)

5

F de VRS ligador corto foldon HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSEKRRRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNEIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSEKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTFCWKLHTSPLCCTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNGRIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSAGSG
HHHHHH (SEQ ID NO:53)

10

F de VRS ligador largo foldon HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSEKRRRFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNEIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSEKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTFCWKLHTSPLCCTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNGRIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNNKNDDKSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG
GSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:54)

15

F_VRS_ecto_pre_his

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELP3RFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRLGFLG
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT2PCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF3SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP3DEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH
(SEQ ID NO:55)

ECTO PRE HA HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELP3RFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRRLGFLG
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT2PCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF3SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP3DEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKSGGSAGSGHHHHH (SEQ
ID NO:56)

5

F de VRS ECTO Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNANNTNVTLSSQNQNQNLGFLG
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT2PCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF3SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP3DEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH
(SEQ ID NO:57)

10

F de VRS ECTO delp21 GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNANNTNVTLSSQNQNQNLGFLG
QMQNQNLGFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYID
KQLLPVFNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQ
KKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT2PCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG
WYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSL
GAIVSCYGKTCTASNKNRGIKTF3SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYD
PLVFP3DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO:58)

15 (el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está delecionado)

F de VRS ECTO delp23 Furx GCN HIS

```

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCEAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQN-----
QQQHFELGELLGVGSALIASGVAVSKVLHLEGEVNNIKSALLSTNKAVVSLSRGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
LLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNELLEITREFSVNAGVTFPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKK
LMSHNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLNTSPLOTTNTKEGSGNICLTRTRGWY
CDNAGSVSFPFQAETCKVQSNRVFCOTMNSLTLPEVNLCNVLIENPKYDCKINTSKTDVSSSVITSLGA
IVSCYGTCTCTASNNKRGIIKTFPNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV

FPSEEDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVN
DKIEELSKIIYHIENEIARIKKLIGESGGGAGSGHRRHHN (SEQ ID NO:59)

```

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)
F de VRS ECTO delp23 Furdel GCN HIS

```

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCEAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQN-----
QQQHFELGELLGVGSALIASGVAVSKVLHLEGEVNNIKSALLSTNKAVVSLNCGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
LLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNELLEITREFSVNAGVTFPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKK
LMSHNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLNTSPLOTTNTKEGSGNICLTRTRGWY
CDNAGSVSFPFQAETCKVQSNRVFCOTMNSLTLPEVNLCNVLIENPKYDCKINTSKTDVSSSVITSLGA
IVSCYGTCTCTASNNKRGIIKTFPNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
FPSEEDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVN
DKIEELSKIIYHIENEIARIKKLIGESGGGAGSGHRRHHN (SEQ ID NO:60)

```

5

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)
F de VRS longitud completa Furx

10

```

MELLILKANAIITTTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCEAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDARVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAWNTNVTLSQPQMNFLGF
ELGVGSALIASGVAVSEVLHLEGEVNNIKSALLSTNKAVVSLNCGVSVLTSKVLDLKNYIDKQELFTVNEQ
SCSISNIETVIEFQQKNNELLEITREFSVNAGVTFPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSHNVQI
VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLNTSPLOTTNTKEGSGNICLTRTRGWYCDNAGSV
FPFQAETCKVQSNRVFCOTMNSLTLPEVNLCNVLIENPKYDCKINTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGT
KCTASNNKRGIIKTFPNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEED
ASISQVNEKINQSLAFIRKSDLLHNVN
AGKSTTNIMITTTIIVIVILSLZAVGLLIXCARSTEVTLKQDLSGENSEIATSN (SEQ ID
NO: 61)

```

F de VRS longitud completa delp21

```

MELLI LKANAITTILTAVTFCFASGQNIETEFYQSTCSAVSEKGYLSALSTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVRLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTFATNNQAQN-----
QNQNQNFLEFLLGVGSAIASGVAVSKVLRLEGEVNKIKKALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLGLKKNYID
EQLLPIVNRQSCSISNIETVIEFQQKNRALLEITREFSVNAGVTTFVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQ
KKLMSENNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVLDTPCWKLRTSPLCTTNTKEGSENICLRTDRG
WYCDNAGSVSFPFQAETCKVQSNVFCDTMNSLTLPSEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
GAIVBCYSGTKCTASNNKRGIIKTFENGCDYVENKGVDTVSVGNELYYVNRQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELNNV
AGKSTTNIMITTTIIIVTIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSEKQLSGGINNIAPSN (SEQ ID
NO: 62)

```

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)

F de VRS longitud completa p23 Furx GCN HIS

```

MELLI LKANAITTILTAVTFCFASGQNIETEFYQSTCSAVSEKGYLSALSTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVRLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTFATNNQAQN-----
QNQNQNFLEFLLGVGSAIASGVAVSKVLRLEGEVNKIKKALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLGLKKNYIDKQ
LLPIVNRQSCSISNIETVIEFQQKNRALLEITREFSVNAGVTTFVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKN
LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVLDTPCWKLRTSPLCTTNTKEGSENICLRTDRGWY
CDNAGSVSFPFQAETCKVQSNVFCDTMNSLTLPSEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
IVSCYSGTKCTASNNKRGIIKTFENGCDYVENKGVDTVSVGNELYYVNRQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELNNV
AGKSTTNIMITTTIIIVTIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSEKQLSGGINNIAPSN (SEQ ID
NO: 63)

```

5

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)

F de VRS longitud completa p23 Furdel GCN HIS

```

MELLI LKANAITTILTAVTFCFASGQNIETEFYQSTCSAVSEKGYLSALSTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVRLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTFATNNQAQN-----
QQQNFLEFLLGVGSAIASGVAVSKVLRLEGEVNKIKKALLSTNKAVVSLNGVSVLTSEKVLGLKKNYIDKQ
LLPIVNRQSCSISNIETVIEFQQKNRALLEITREFSVNAGVTTFVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKN
LMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVLDTPCWKLRTSPLCTTNTKEGSENICLRTDRGWY
CDNAGSVSFPFQAETCKVQSNVFCDTMNSLTLPSEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGA
IVSCYSGTKCTASNNKRGIIKTFENGCDYVENKGVDTVSVGNELYYVNRQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
FPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELNNV
AGKSTTNIMITTTIIIVTIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSEKQLSGGINNIAPSN (SEQ ID
NO: 64)

```

(el símbolo "-" indica que el aminoácido en esta posición está deletado)

10 F de VRS furina N-term Furx truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSKKRKRRLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAEETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:65)

F de VRS furina C-term Furx truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAQQTNVTLSQNNQNFGLF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAEETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:66)

F de VRS delección de fusión 1 truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNTVTLSKKRKRRLSAIA
SGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSISNIET
VIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIM
SIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAEETCK
VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASNKNR
GIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDEFDASISQVNEKI
NQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:67)

F de VRS delección de fusión 2 truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNTVTLSKKRKRRLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSISN
IETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY
SIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAE
ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTCTASN
KNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDEFDASISQVN
EKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:68)

F de VRS Furx truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSQNNQNFGLF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAEETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDEFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:69)

F de VRS Furx truncado

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTVLSQNQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVITPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSXTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDDELLHNVNAGKSTTN (SEQ ID NO:70)

F de VRS delP23 furdel truncado sin HIS (para células CHO)

5

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRQ-----
QQQNPLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQ
LLETYNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVITPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK
LMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWY
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSXTDVSSSVITSLGA
IVSCYGKTCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV
FPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDDELLHNVNAGKSTTN

(SEQ ID NO: 71)

(el símbolo “-” indica que el aminoácido en esta posición está delecionado)

F de VRS (Tn) truncado HIS

10

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVITPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSXTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO: 84)

F de VRS antiguo furx truncado HIS

15

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
GTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELQRFMNYTLNNAKKTNTVLSQNQNQNFLGF
LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQ
SCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVITPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
VRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSXTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
SISQVNEKINQSLAFIRKSDDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:86)

F de VRS Furx R113Q K123N K124N truncado HIS

20

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTVTLSONQNQNLGFLG
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 ACTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:89)

F de VRS furina N-term truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAQQTNTVTLSONQNQNLGFLG
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 ACTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:85)

5

F de VRS delP21 furdel truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAQQTNTVTLSONQNQNLGFLG
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 ACTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
 NO: 86)

10

F de VRS furina C-term truncado HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCN
 GTDAVKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNTVTLSSKKRKRRLGFLG
 LLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQ
 SCSISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQI
 VRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
 ACTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDA
 SISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:87)

15 Ejemplo 2 - Expresión y purificación de constructos de F de VRS

Los constructos truncados y ECTO de F de VRS, que carecen del dominio transmembrana y la región de cola
 citoplasmática o bien con sitios de escisión de furina de tipo natural o bien que albergan mutaciones de desactivación
 en los sitios de escisión de furina y con o sin mutaciones de estabilización de prefusión, se clonaron en un vector de
 expresión de baculovirus pFastBac (Invitrogen). Varios de estos constructos contienen un ligador flexible C-terminal
 seguido por una secuencia de etiqueta His6 usada para la purificación por quelación. La producción de reservas de
 baculovirus de alto título se hizo pasar en células de insecto Sf9. Se expresaron proteínas infectando células o bien
 Sf9, Tn5 o bien High Five con el baculovirus requerido y recogiendo el sobrenadante del medio dos o tres días tras la
 infección, se monitorizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-VRS F o anti-
 6HIS.

25

El medio de expresión a gran escala se concentró/purificó mediante una de dos estrategias generales para eliminar el
 efecto perjudicial de la ferritina presente en el medio de células de insecto que corrompe la resina quelante. El primer

enfoque fue concentrar los aproximadamente 10-20 litros de medio de expresión de insectos hasta aproximadamente 300 ml usando una columna de concentración de fibra GE Healthcare HolloTube. Se añadió sulfato de cobre a esta mezcla concentrada hasta una concentración final de 500 μ M y se cargó la disolución resultante sobre columnas quelantes HiTrap de 5 ml. Entonces se eluyó la proteína etiquetada con HIS unida de la columna con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

En la segunda estrategia de purificación, se añadió CuCl_2 al sobrenadante del medio hasta una concentración final de 500 μ M. A cada 1 litro de medio, se añadieron cuatro mililitros de resina de quelación (Chelating Resin, BioRad) y se agitó la suspensión durante al menos treinta minutos a 4 grados centígrados y se separaron la resina y el medio mediante una columna de gravedad. Se lavó la resina con diez veces el volumen de la columna de tampón de equilibrado (Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM) y se eluyó la proteína F con diez veces el volumen de la columna de tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 250 mM). Se dializó la elución frente a tampón Tris 25 mM pH 7,5, y se cargó la disolución resultante sobre una columna de quelación Hitrap de 5 ml cargada con NiSO_4 y se eluyó con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Se evaluaron las eluciones del gradiente de imidazol en cualquier caso usando geles de tipo Western anti-6HIS y coomassie. Se recogieron las fracciones que contenían constructos puros, se dializaron frente a diferentes tampones/soluciones salinas y se concentraron para su análisis posterior usando concentradores Millipore Centrprep y/o unidades de concentración Vivaspin. También se desarrolló un protocolo de purificación por exclusión molecular capaz de purificar adicionalmente trímeros de VRS monodispersos a partir de rosetas (a continuación).

Análisis de SEC de proteínas F de VRS:

Una característica documentada de otras proteínas de fusión de paramixovirus estabilizadas en su conformación de prefusión es que, incluso cuando se escinden de modo que el péptido de fusión queda expuesto, no forman rosetas tal como se observa para la conformación de posfusión. Un simple análisis de cromatografía de exclusión molecular permite la identificación de una proteína y la determinación de si una proteína está formando rosetas. Se desarrollaron dos métodos, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también sirven como etapa de purificación eficiente.

Se realizó HPLC-SEC usando una columna de SEC de Biorad (18 mm) con una fase móvil de Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de HPLC-SEC de Biorad para calibrar el sistema, se encontró que las rosetas de VRS (que representan conformaciones de posfusión escindidas) eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de VRS (presuntos trímeros del análisis de EM posterior) eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa.

Se realizó FPLC-SEC sobre una FPLC de GE Healthcare usando una columna 16/60 Superdex 200 con una fase móvil de Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de alto peso molecular de GE Healthcare para calibrar el sistema, se encontró que las rosetas de VRS eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa.

Microscopía electrónica (EM) de proteínas F de VRS.

Se absorbieron disoluciones de proteína de aproximadamente 50 microgramos por ml de constructos de F de VRS sobre rejillas recubiertas con carbono sometidas a descarga luminiscente y se tiñeron negativamente con fosfotungstato de sodio al 2 % (pH 7,0) o formiato de uranilo al 0,75 % (pH bajo no cuantificado). Se observaron las rejillas en un microscopio electrónico de transmisión Technai Spirit o JOEL 1230 que funcionaba a entre 80-120 kV con unos aumentos de entre 20.000 y 150.000 dependiendo de la resolución requerida.

Tabla 2

Constructo	Conformación mediante EM
F de VRS ECTO HIS	Predominantemente rosetas
F de VRS Furdel ECTO (escindido)	Predominantemente rosetas
F de VRS Delp23 Furdel truncado (no escindido)	Trímeros observados
F de VRS delección de péptido de fusión 1 truncado (no escindido)	Trímeros
F de VRS Delp23 Furdel truncado (escindido mediante tripsina tras la purificación)	Predominantemente rosetas con algunos trímeros
F de VRS Delp23 Furdel truncado (escindido mediante tripsina tras la purificación en presencia de un disco de nanolípidos)	Rosetas asimétricas con disco de nanolípidos aparente en el centro de la roseta

Ejemplo 3 - Detección de F de VRS de prefusión y posfusión

Están disponibles varios métodos para determinar la conformación de la proteína F de VRS para someter a ensayo si

una modificación en el polipéptido F de VRS o una molécula añadida desfavorece la conformación de posfusión. Los ejemplos incluyen asociación de liposomas, anticuerpos monoclonales específicos de conformación (incluyendo tal como se usan en FACS, ELISA, etc.), microscopía electrónica, sensibilidad a proteasas diferencial entre las conformaciones, cromatografía de filtración en gel, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, experimentos de RMN de intercambio de deuterio, espectrometría de masas, espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, espectroscopía de triptófano y cristalografía de rayos X.

Asociación de liposomas

Puede usarse la asociación de liposomas para someter a ensayo la conformación de la proteína F de VRS. Las formas solubles de la proteína F de VRS en la conformación de prefusión no se asociarán con los liposomas, mientras que la conformación de posfusión se asociará con los liposomas.

Pueden prepararse liposomas tal como sigue: se mezclan 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y colesterol en cloroformo (disponibles de Avanti Polar Lipids) a una razón molar de 8:2:5. El cloroformo se evapora bajo argón. Se formará una película lipídica que se seca al vacío durante la noche y se resuspende en PBS a 40 mM de lípidos totales. Después de cinco ciclos de congelación-descongelación, los lípidos se agitan con vórtex y extruyen 21 veces a través de dos filtros de 100 µm usando una miniextrusora (disponible de Avanti Polar Lipids).

Una vez que se han preparado los liposomas, puede realizarse el ensayo de asociación de liposomas. Para cada muestra que va a someterse a prueba, se escinden 2 µg del polipéptido F de VRS que va a someterse a prueba con 25 miliunidades de tripsina (disponible de Worthington Biochemical) en tampón fosfato 100 mM (pH 7,1) durante 30 min a 25 °C. Después de la escisión, se añaden 40 µg de inhibidor de tripsina de soja (disponible de Worthington Biochemical) a cada muestra para finalizar la reacción. Las muestras se pretratan a 60 °C durante 30 min, lo que induciría un cambio conformacional desde las formas de prefusión a las de posfusión en la proteína F de VRS nativa aislada. Se añaden liposomas (40 µl por muestra) y PBS (80 µl de volumen final), y se incuban las muestras a 60 °C durante 30 min. Se añade sacarosa hasta una concentración final del 50% (500 µl de volumen final). Las muestras se recubren con 500 µl cada una de sacarosa al 40%, sacarosa al 25% y PBS y se centrifugan en un rotor TLS55 a 49.000 rpm durante 3 h a 25 °C. Se recogen fracciones (500 µl) de la parte superior de los gradientes. Las proteínas se solubilizan en Triton X-100 al 0,5 % y se precipitan usando ácido tricloroacético al 12,5 % vol/vol. Los polipéptidos se separan mediante SDS/PAGE y se transfieren a membranas de PVDF. Las inmunotransferencias se someten a prueba con anticuerpos monoclonales anti-F de VRS.

Microscopía electrónica

Se usó microscopía electrónica para someter a ensayo la distribución conformacional de los polipéptidos F de VRS. Los polipéptidos F de VRS en la forma de prefusión tienen una forma de "bola y tallo" con una longitud de ~12 nm. En cambio, los polipéptidos R de VRS en la forma de posfusión tienen una forma de "soporte de golf" con una longitud de ~16 nm. Además, los péptidos de fusión en el extremo estrecho de los "soportes de golf" se agregan formando estructuras en forma de roseta. Por tanto, puede usarse microscopía electrónica para someter a ensayo la distribución de conformaciones en una muestra de polipéptidos R de VRS debido a las formas fácilmente distinguibles.

Ejemplo 4 Trómeros y rosetas de ectodominio de F de VRS

Los constructos de ectodominio de proteína F de VRS, que codifican polipéptidos que carecen del dominio transmembrana y la región de cola citoplasmática o bien con sitios de escisión de furina de tipo natural o bien que albergan mutaciones de desactivación en los sitios de escisión de furina y/o mutaciones de péptido de fusión, se clonaron en un vector de expresión de baculovirus pFastBac (Invitrogen). Varios de estos constructos contienen un ligador flexible C-terminal seguido por una secuencia de etiqueta HIS₆ usada para la purificación por quelación. La producción de reservas de baculovirus de alto título se obtuvo mediante pase en células de insecto Sf9. Se expresaron proteínas infectando células o bien Sf9, Tn5 o bien High Five con el baculovirus requerido y recogiendo el sobrenadante de medio acondicionado dos o tres días tras la infección. Se monitorizó la producción de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-F de VRS o anti-HIS₆.

El medio de expresión a gran escala se concentró/purificó usando una de dos estrategias generales para eliminar el efecto perjudicial de la ferritina presente en el medio de células de insecto, que puede corromper la resina quelante. El primer enfoque fue concentrar los aproximadamente 10-20 litros de medio de expresión de insectos hasta aproximadamente 300 ml usando una columna de concentración de fibras Hollotube de GE Healthcare. Se añadió sulfato de cobre a esta mezcla concentrada hasta una concentración final de 500 µM, y se cargó la disolución resultante sobre columnas quelantes HiTrap de 5 ml. Entonces se eluyó la proteína etiquetada con HIS unida de la columna con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

En la segunda estrategia de purificación, se añadió CuCl₂ al sobrenadante del medio hasta una concentración final de 500 µM. A cada 1 litro de medio, se añadieron de aproximadamente cuatro a diez mililitros de resina quelante

(Chelating Resin, BioRad), y se agitó la suspensión durante al menos treinta minutos a 4 grados centígrados, y se separaron la resina y el medio usando una columna de gravedad. Se lavó la resina con aproximadamente diez veces el volumen de la columna de tampón de equilibrado (Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM), y se eluyó el ectodominio de proteína F con aproximadamente diez veces el volumen de la columna de tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 250 mM). Se dializó la elución frente a tampón Tris 25 mM pH 7,5, y se cargó la disolución resultante sobre una columna de quelación Hitrap de 5 ml cargada con NiSO₄. Se eluyó la proteína unida con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Se evaluaron las eluciones del gradiente de imidazol en cualquier caso usando inmunotransferencias de tipo Western anti-HIS₆ y/o geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Se recogieron las fracciones que contenían constructos puros, se dializaron frente a diferentes tampones/soluciones salinas y se concentraron para su análisis posterior usando concentradores Millipore Centriprep y/o unidades de concentración Vivaspin. En algunos casos, se purificaron adicionalmente monómeros, trímeros o rosetas usando cromatografía de exclusión molecular.

Análisis de SEC y purificación de ectodominios de F de VRS

Se usó cromatografía de exclusión molecular para purificar y analizar monómeros, trímeros y rosetas de ectodominio de proteína F de VRS. Este método también permitió que se purificaran ectodominios de proteína F de VRS no escindidos de contaminantes lipídicos y lipoproteicos derivados de la célula huésped o el medio. Se desarrollaron dos métodos, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también sirven como etapa de purificación eficiente.

Se realizó HPLC-SEC usando una columna de SEC de Biorad (18 mm) con una fase móvil de Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de HPLC-SEC de Biorad para calibrar el sistema, se encontró que las rosetas de VRS (que representan conformaciones de posfusión, escindidas) eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los monómeros de F de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa.

Se realizó FPLC-SEC sobre una FPLC de GE Healthcare usando una columna 16/60 Superdex 200 con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM como fase móvil. Usando patrones de al peso molecular de GE Healthcare para calibrar el sistema, se encontró que las rosetas de VRS eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 140-160 kDa y los monómeros de F de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa.

Para la purificación, se usó el método de FPLC-SEC y se recogieron fracciones de 1 ml.

Escisión con tripsina de los constructos Furdel o Delp23 Furdel para formar rosetas de posfusión

En general, la digestión con tripsina de los monómeros Delp23 Furdel se realiza con tripsina:F de VRS 1:1000 en peso, o 10-15 unidades BAEE de tripsina por 1 mg de antígeno F de VRS. En una reacción típica, se diluyó tripsina de plasma bovino (Sigma Aldrich, T8802: 10.000-15.000 unidades BAEE/mg de tripsina) hasta una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM. Una disolución de 1 mg/ml de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS (diluido en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM) se trató con un microlitro de disolución de tripsina (razón en masa final de tripsina:F de VRS 0,001:1 o aproximadamente 10-15 unidades BAEE de tripsina con respecto a cada miligramo de F de VRS) durante 1 hora a 37 °C. Normalmente, se monitorizó el progreso de la reacción de escisión mediante gel de SDS-PAGE. Se detuvo la reacción de escisión usando un inhibidor de tripsina. La proteína F de VRS escindida se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión molecular.

En ocasiones, se añadió un volumen 1:100 de inhibidor de tripsina inmovilizado (Sigma) o 1 microlitro de inhibidor de tripsina de soja 1 mM a la disolución de escisión y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-30 minutos con agitación suave para detener la reacción de la tripsina. Se separó la resina de inhibidor de la disolución de proteína usando columnas de microcentrífuga. Se purificó la disolución resultante mediante purificación por SEC.

Microscopía electrónica (EM) de proteínas F de VRS.

Se absorbieron polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS (aproximadamente 50 microgramos por ml), sobre rejillas recubiertas con carbono sometidas a descarga luminiscente y se tiñeron negativamente con fosfotungstato de sodio al 2 % (pH 7,0) o formiato de uranilo al 0,75 % (pH bajo no cuantificado). Se observaron las rejillas en un microscopio electrónico de transmisión Technai Spirit o JOEL 1230 que funcionaba a entre 80-120 kV con unos aumentos de entre 20.000 y 150.000 dependiendo de la resolución requerida.

Ensayo de fosfolípidos

Este ensayo se basa en el ensayo de fosfolípidos C colina oxidasa – método DAOS de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (n.º de cat. 433-36201). El protocolo del ensayo se modifica solo para reducir la cantidad de material usado en el ensayo, y para disminuir la dilución de las muestras en la reacción en relación con el protocolo general del proveedor. Para determinar el contenido de lípidos de la muestra de F de VRS, se genera el reactivo de color disolviendo una

botella de reactivo de color con una botella tampón (el reactivo de color es estable durante 1 semana a 4 °C). Se diluye el patrón de fosfolípidos de 300 mg/dl (3 mg/ml) hasta 1,5, 1,0, 0,75, 0,5 y 0,25 mg/ml con agua destilada. Para cada patrón, un blanco de agua y una reacción de muestra se añaden a un tubo de microcentrifuga 10 µl de reactivo de color y 2 µl de o bien patrón, agua destilada (patrón de 0 mg/ml) o bien muestra. Se centrifugan las reacciones brevemente para garantizar un mezclado apropiado y se incuban los tubos durante 15 min a 37 °C. Se registra la absorbancia a 595 nm para cada punto de patrón y se genera una curva patrón. Se registra la absorbancia a 595 nm para cada muestra y se calcula la concentración de fosfolípidos a partir de la curva de calibración preparada.

Inmunogenicidad en ratas algodoneras

La inmunogenicidad de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS en las formas de monómeros (delp21 furx no escidido), rosetas de trímeros (delp23 furdel escidido) y trímeros (deleción de péptido de fusión) se determinó en ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*) en dos estudios. En el estudio 1 (figuras 8A y 8B), 10 ratas algodoneras por grupo se vacunaron por vía intramuscular con 10 µg de monómeros o rosetas (cada uno adsorbido a hidróxido de aluminio) los días 0 y 21. Se midieron los títulos en suero de IgG anti-proteína F de VRS y de anticuerpos neutralizantes de VRS 2 semanas después de la 1ª vacunación (2wp1) y 2 semanas después de la 2ª vacunación (2wp2), o 3 semanas después de la 1ª vacunación (3wp1) y 2 semanas después de la 2ª vacunación (2wp2). Se determinó IgG anti-proteína F de VRS (figura 8A) mediante ELISA usando placas recubiertas con proteína F de VRS y anticuerpos de detección de pollo anti-IgG de rata algodонера conjugado con peroxidasa del rábano. Los datos se presentan como log₁₀ de títulos medios geométricos (GMT) + desviaciones estándar de ratas algodoneras individuales. Se midieron los títulos de neutralización de VRS (figura 8B) mediante la prueba de neutralización de reducción de placas (PRNT). En resumen, se preincubaron diluciones de suero inactivado por calor con VRS Long, y luego se inocularon sobre células HEP-2 en placas de 12 pocillos. Después de una infección de 2 horas, se retiró el inóculo y se recubrieron las células con agarosa. Se enumeraron las placas 5 días después mediante tinción con rojo neutro. El título de neutralización se define como el inverso de la dilución de suero que produce una reducción de al menos el 60 % en el número de placas por pocillo, en relación con los controles (sin suero). Los datos se presentan como log₁₀ de GMT + error estándar de 2 conjuntos de 5 ratas algodoneras por grupo.

En el estudio 2 (figura 8C), se inmunizaron 9 ratas algodoneras por grupo por vía intramuscular con las dosis indicadas de monómeros, trímeros o rosetas (cada uno adsorbido a hidróxido de aluminio). Se midieron los títulos de IgG anti-proteína F de VRS en suero 2wp1 como anteriormente.

Resultados

Se expresó el ectodominio de F de VRS soluble (con sitios de escisión de furina no mutados), pero no pudo purificarse de las impurezas de lípidos y lipoproteínas derivadas de las células huésped o los medios de cultivo usando cromatografía de exclusión molecular. Estos polipéptidos de ectodominio de F de VRS eluyen en el volumen vacío de la columna de SEC junto con los contaminantes lipídicos y lipoproteicos.

Se prepararon varios constructos para fabricar polipéptidos de ectodominio F de VRS que contienen mutaciones en los sitios de escisión de furina, incluyendo los constructos Furdel. Véase la figura 1. Los polipéptidos producidos por la expresión de los constructos Furdel se secretaron de las células como una especie no escindida de ~65 kDa. La mutación de Furdel también impide la exposición del péptido de fusión, lo que a su vez impide la formación de rosetas. Como resultado, F de VRS Furdel soluble migró en el volumen incluido de una columna preparatoria Superdex 200, dando como resultado la separación tanto de los restos de lípidos, que eluyeron en el volumen vacío, como de la impureza de proteína de insecto. Estos resultados muestran que los polipéptidos de ectodominio de F de VRS en los que se han mutado los sitios de escisión de furina se producen como polipéptido no escindido que puede purificarse mediante SEC. Además, el análisis del tiempo de retención de F de VRS no escindido fue consecuente con que los polipéptidos fueran monómeros en lugar de trímeros.

Se evaluó adicionalmente si los polipéptidos de F de VRS furdel eran monómeros, trímeros o una mezcla de monómeros y trímeros usando ultracentrifugación analítica. Se realizaron estudios de ultracentrifugación analítica usando proteína purificada del pico de monómero de la purificación por SEC. Los datos de velocidad de sedimentación de F de VRS no escindido mostraron un patrón escalonado, lo que sugiere dos especies en disolución. El análisis del experimento de velocidad de sedimentación mostró que el ectodominio de F de VRS no escindido tenía una alta población de monómero y una población menor de trimero aparente en la disolución. Se recogieron datos de ejecución en equilibrio y se realizaron intentos de ajustar los datos a un modelo de monómero ideal o un modelo de equilibrio de monómero-trímero. Sin embargo, los residuales de los ajustes son escasos, particularmente hacia el fondo de la célula donde la concentración de proteína es mayor. Estas observaciones sugirieron que los polipéptidos de ectodominio de F de VRS no escindidos son predominantemente un monómero con una población más pequeña que se autoasocia (potencialmente como trímeros) o se agrega a concentraciones superiores.

Se realizó un análisis adicional de polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS seleccionados usando cromatografía de exclusión molecular (SEC). Figuras 6A-6D. Los picos principales que contienen monómeros, trímeros o rosetas de trímeros se indican mediante un asterisco en las figuras 6A-6D, con el tiempo de retención de la columna Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) indicado en mililitros. En una columna calibrada, los tiempos de retención

aproximados de 47 ml, 65 ml y 77 ml corresponden al volumen vacío de la columna, la retención de trímeros de F y la retención de monómeros, respectivamente. En la figura 6A, el constructo Delp23 Furdel ($\Delta p23$ Furdel) no escindido se purificó del pico de monómero. Cuando el antígeno F de VRS Delp23 Furdel no escindido se trató con tripsina, la proteína formó rosetas, que migraron en SEC en el volumen vacío (figura 6B). La especie de trímero escindido de la

5 deleción del péptido de fusión de F de VRS se purificó del pico de trímero con un tiempo de retención de aproximadamente 65 ml (figura 6C), mientras que el constructo Delp21 Furx no escindido ($\Delta p21$ Furx) se purificó del pico de monómero a aproximadamente 77 ml (figura 6D).

Varios polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS en forma no escindida o después de la escisión con tripsina se evaluaron mediante EM. Los constructos F de VRS Furdel y delp23 Furdel tienen residuos de arginina que quedan en el sitio de escisión de furina. Estas argininas son susceptibles a la escisión con tripsina. Tras la escisión, la especie F₀ no escindida se convirtió en las especies F₁/F₂, en las que se expone el péptido de fusión. El análisis de EM confirmó que, después de la escisión con tripsina, los ectodominios de VRS no escindidos formaron rosetas de trímeros en virtud de sus péptidos de fusión, como se ha observado para proteínas de fusión relacionadas. Los resultados se

10 presentan en la tabla 3 y muestran que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS no escindidos pueden escindirse formando rosetas de trímeros. El constructo deleción de péptido de fusión, que se escinde mediante furina, formó trímeros monodispersos. Véanse, también, las figuras 7A-7D. Ventajosamente, la producción de rosetas de trímeros de esta manera da como resultado rosetas de trímeros que están sustancialmente libres de restos de lípidos y lipoproteínas.

Los resultados de los estudios de inmunogenicidad mostraron que los polipéptidos de ectodominio de proteína F de VRS en forma de monómeros (delp21 furx no escindido), rosetas de trímeros (delp23 furdel escindido) y trímeros (deleción de péptido de fusión) eran inmunogénicos en ratas alodóneras (*Sigmodon hispidus*), e indujeron anticuerpos neutralizantes. Figuras 8A-8C.

Tabla 3	
Constructo	Conformación mediante EM
Ectodominio de tipo natural de F de VRS (escindido en la célula huésped durante la expresión)	Rosetas de trímeros asociadas con restos de lípidos
Furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado – no escindido)	Variable. Algunas preparaciones mostraron trímeros monodispersos; otras muestran poco material visible mediante EM de material teñido negativamente
Furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado – escindido con tripsina tras la purificación)	Rosetas de trímeros
delp23 furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado – no escindido)	Variable. Algunas preparaciones mostraron trímeros monodispersos; otras muestran poco material visible mediante EM de material teñido negativamente
delp23 Furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado – escindido con tripsina tras la purificación)	Rosetas de trímeros
Deleción de péptido de fusión escindido (pico de monómero purificado)	Trímeros monodispersos

Ejemplo 5 - Métodos para producir antígenos de subunidad F de VRS en células de insecto o CHO

Purificación de antígeno F de VRS de células de insecto:

Se expresaron subunidades de ectodominio de F de VRS, incluyendo los constructos Delp21 Furx, Delp23 Furdel y deleción de péptido de fusión, en células de insecto HiFive (Invitrogen) usando el sistema de baculovirus pFAST Bac. La subunidad de F de VRS se purificó de las expresiones a gran escala, 10-25 litros, por medio de un método de

35 quelación de dos etapas que redujo el efecto perjudicial del contaminante de ferritina en los medios de células de insecto, que puede corromper la resina quelante. Se añadió CuSO₄ al sobrenadante del medio hasta una concentración final de 500 μ M. Se añadieron de aproximadamente diez a veinte mililitros de resina quelante (Chelating Resin, BioRad) a cada 1 litro de medio, se agitó la suspensión durante al menos treinta minutos a 4 °C, y se separaron la resina y el medio usando una columna de gravedad. Se lavó la resina con aproximadamente dos veces el volumen de resina de tampón de equilibrado (Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM), y se eluyó el ectodominio de proteína F con

40 aproximadamente dos veces el volumen de la columna de tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 250 mM). Se dializó la elución frente a tampón Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y se cargó la disolución resultante sobre una columna de quelación Hitrap de 5 ml cargada con NiSO₄ (GE Healthcare). Se eluyó la proteína unida con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Se evaluaron las eluciones del gradiente de imidazol en ambos casos usando inmunotransferencias de tipo Western anti-HIS₆ y/o geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Se recogieron las fracciones que contenían constructos

puros y se concentraron hasta aproximadamente 1 mg/ml usando concentradores Millipore Centriprep y/o unidades de concentración Vivaspin para el posterior análisis/purificación mediante cromatografía de exclusión molecular.

Análisis de SEC y purificación de ectodominios de F de VRS

Se usó cromatografía de exclusión molecular (SEC) para purificar y analizar monómeros no escindidos y trímeros escindidos de ectodominio de proteína F de VRS. Este método también permitió que se purificaran ectodominios de proteína F de VRS no escindidos de contaminantes lipídicos y lipoproteicos derivados de la célula huésped o el medio. En el caso de la generación de rosetas limpias, el constructo Delp23 Furdel no escindido se purificó inicialmente como un monómero y posteriormente se trató con proteasa y volvió a purificarse usando SEC para purificar rosetas homogéneas (véase a continuación). Se desarrollaron dos métodos para el análisis de la oligomerización de F de VRS, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también pueden servir como etapa de purificación eficiente.

Se realizó HPLC-SEC usando una columna de SEC de Biorad (18 mm) con una fase móvil de Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM. Usando patrones de HPLC-SEC de Biorad para calibrar el sistema, se encontró que las rosetas de VRS (que representan conformaciones de posfusión, no escindidas) eluyen en el volumen vacío de la columna del mientras que los monómeros de F de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa.

Se realizó FPLC-SEC sobre una FPLC de GE Healthcare usando una columna 16/60 Superdex 200 con Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM como fase móvil. Usando patrones de al peso molecular GE Healthcare para calibrar el sistema, se encontró que las rosetas de VRS eluyen en el volumen vacío de la columna del análisis, mientras que los trímeros monodispersos de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 140-160 kDa y los monómeros de F de VRS eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa. Para la purificación de Delp21 Furx o Delp23 Furdel no escindidos de VRS (monómeros) o delección de péptido de fusión (trímero), se cargaron 0,5-2 ml de material purificado por quelación de aproximadamente 1 mg/ml sobre una columna Superdex P200 16/60 equilibrada con una velocidad de flujo de entre 0,5-2 ml/min y se recogieron fracciones relevantes.

Escisión con tripsina de constructos Delp23 Furdel para formar rosetas de posfusión

Se diluyó tripsina de plasma bovino (Sigma Aldrich, T8802: 10.000-15.000 unidades BAEE/mg de tripsina) hasta una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM. Una disolución de 1 mg/ml de polipéptido de ectodominio de proteína F de VRS (diluido en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM) se trató con un microlitro de disolución de tripsina (razón en masa final de tripsina:F de VRS 0,001:1 o aproximadamente 10-15 unidades BAEE de tripsina con respecto a cada miligramo de F de VRS) durante 1 hora a 37 °C. Se monitorizó el progreso de la reacción de escisión mediante gel de SDS-PAGE. Se detuvo la reacción de escisión usando un inhibidor de tripsina (inhibidor de tripsina de soja de Gibco usando una masa igual de inhibidor con respecto a tripsina). Se encontró que se requería un periodo de incubación entre la etapa de escisión y la purificación de rosetas posterior para permitir una mayor eficiencia de la conversión de monómeros en rosetas. Se facilitó un periodo de incubación de una a 6 horas a 37 °C para proporcionar una mayor eficiencia de formación de rosetas. La proteína F de VRS escindida se purificó adicionalmente de especies de monómero sin convertir usando cromatografía de exclusión molecular (tal como se describió anteriormente) donde pueden recogerse rosetas homogéneas en las fracciones de volumen vacío de la columna.

Purificación de antígeno F de VRS a partir de células CHO:

Se purificaron constructos de delección de péptido de fusión de F de VRS, que no contienen una etiqueta HIS, mediante purificación catiónica. El material de CHO que contiene antígeno de trímero de F de VRS expresado se concentró hasta aproximadamente una décima parte del volumen original en un sistema de concentración de cartucho de fibras huecas de GE Healthcare (MWCO 10.000 kDa). Entonces se intercambió el tampón de la disolución concentrada cuatro veces con un volumen equivalente de acetato de sodio 25 mM pH 6,0, NaCl 25 mM. La disolución resultante, que contenía trímero de F de VRS concentrado en el tampón acetato/solución salina, se cargó sobre una columna GE Healthcare HiTrap CM precargada que se había equilibrado con tampón acetato/solución salina. Se eluyó la proteína de la columna usando un gradiente escalonado de tampón acetato 25 mM que contenía NaCl o bien 25, 150, 250, 500 o bien 1000 mM (conteniendo las fracciones de NaCl 250 mM y 500 mM la mayor parte del material eluido). Este material podía purificarse adicionalmente usando una purificación por SEC similar al protocolo anterior.

Ejemplo 6 – Inmunogenicidad de subunidades de F de VRS en ratas algodonerías

La inmunogenicidad y capacidad protectora de las subunidades de trímero (F de VRS-delección de péptido de fusión-trunc) y roseta (F de VRS-delp23-furdel-trunc, escindido) de F de VRS, cada una formulada con alumbre o MF59, se evaluó en el modelo de rata algodonería. El antígeno usado para el ELISA en este estudio fue F de VRS-delección de péptido de fusión-trunc (tabla 4). La neutralización fue contra la cepa de VRS infecciosa, Long (tabla 5). Todas las combinaciones fueron inmunogénicas, provocando respuestas de anticuerpos neutralizantes de VRS e IgG específica de F de VRS de alto título que se reforzaron con una segunda vacunación, y proporcionaron protección frente a la exposición nasal a VRS.

Métodos

Vacunación y exposición de ratas algodoneras

Se obtuvieron ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*) hembra de Harlan Laboratories. Se inmunizaron grupos de animales por vía intramuscular (i.m., 100 µl) con las vacunas indicadas los días 0 y 21. Se recogieron muestras de suero 3 semanas después de la primera inmunización (3wp1) y 2 semanas después de la segunda inmunización (2wp2). Se expuso a los animales inmunizados o de control sin vacunar por vía intranasal (i.n.) con 1×10^5 ufp de VRS Long 4 semanas después de la inmunización final. Se realizaron la recogida de sangre y la exposición a VRS bajo anestesia con isoflurano al 3 % usando un vaporizador de precisión.

ELISA específico de F de VRS

Se sometieron a ensayo muestras de suero individuales para determinar la presencia de IgG específica de F de VRS mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Se recubrieron placas de ELISA (MaxiSorp de 96 pocillos, Nunc) durante la noche a 4 °C con F de VRS purificado 1 µg/ml (deleción de péptido de fusión-trunc) en PBS. Después del lavado (PBS con Tween-20 al 0,1 %), se bloquearon las placas con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1,5 horas a 37 °C. Entonces, se lavaron las placas, se añadieron diluciones en serie de suero en diluyente de ensayo (PBS con Tween-20 al 0,1 % y suero de cabra al 5 %) de ratas algodoneras experimentales o de control, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C. Después del lavado, se incubaron las placas con IgG de pollo anti-rata algoconera conjugada con peroxidasa del rábano (HRP) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluida 1:5.000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se lavaron las placas y se añadieron a cada pocillo 100 µl de disolución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de H_3PO_4 1 M, y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas. Para cada muestra de suero, se generó un gráfico de la densidad óptica (DO) frente al logaritmo de la dilución de suero inversa mediante regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución de suero inversa a una DO de aproximadamente 0,5 (normalizada a un patrón, sueros agrupados de ratas algodoneras infectadas con VRS con un título definido de 1:2500, que se incluyó en cada placa).

Ensayo de microneutralización

Se sometieron a prueba muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante un ensayo de microneutralización. Se añadieron diluciones en serie de dos veces de suero inactivado por calor (HI) (en PBS con el 5% de suero bovino fetal (FBS) HI) a un volumen igual de la cepa de VRS Long, titulada previamente para dar aproximadamente 115 UFP/25 µl. Se incubaron mezclas de suero/virus durante 2 horas a 37 °C y el 5 % de CO₂ para permitir que se produjera la neutralización del virus, y luego se inocularon 25 µl de esta mezcla (que contenía aproximadamente 115 UFP) en pocillos duplicados de células HEp-2 en placas de 96 pocillos. Después de 2 horas a 37 °C y el 5 % de CO₂, se recubrieron las células con metilcelulosa al 0,75 %/EMEM el 5% de HI-FBS y se incubaron durante 42 horas. Se determinó el número de partículas de virus infecciosas mediante la detección de la formación de sincitios mediante inmunotinción seguido por recuento automático. El título de neutralización se define como el inverso de la dilución de suero que produce una reducción de al menos el 60 % en el número de sincitios por pocillo, en relación con los controles (sin suero).

Carga viral

Se determinó la carga viral en el pulmón mediante ensayo de placas. Específicamente, se recogieron los pulmones 5 días después de la infección con VRS y se colocó un lóbulo derecho en 2,5 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con sacarosa al 25% y se rompió con un homogeneizador de tejidos. Los sobrenadantes libres de células de estas muestras se almacenaron a -80 °C. Para el ensayo de virus infeccioso, se inocularon diluciones de homogeneizado de pulmón clarificado (en PBS con el 5% de HI-FBS) sobre monocapas de células HEp-2 confluentes en un volumen de 200 µl/pocillo de una placa de 12 pocillos. Después de 2 horas con agitación suave periódica (37 °C, el 5% de CO₂), se retiró el inóculo y se recubrieron las células con 1,5 ml de agarosa SeaPlaque al 1,25 % (Lonza) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Lonza) suplementado con el 5 % de HI-FBS, glutamina y antibióticos. Después de 3-4 días de incubación, se recubrieron las células de nuevo con 1 ml de agarosa al 1,25 % en EMEM (Sigma) que contenía rojo neutro al 0,1 % (Sigma). Las placas se contaron un día después con la ayuda de una caja de luz.

Un método alternativo para determinar la carga viral es la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La carga viral puede determinarse mediante qRT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos específicos para el gen de F de VRS tal como se describe (I. Borg *et al.*, Eur Respir J 2003; 21:944-51) con algunas modificaciones. En resumen, se aísla ARN a partir de 140 µl de homogeneizado de pulmón clarificado, o de un número conocido de unidades formadoras de placa (UFP) de VRS (determinado por ensayo de placas y diluido en homogeneizado de pulmón de animales no infectados), usando el kit RNeasy (Qiagen) con un volumen de elución final de 100 µl de H₂O. La síntesis de ADNc y la PCR se realizan en un solo tubo usando el kit de RT-PCR cuantitativa SuperScript III Platinum One-Step (Invitrogen) con 5 µl de ARN eluido, 10 µM de cada cebador y 50 µM de la sonda (cebadores y sondas de Integrated DNA Technologies). Cebador directo: TTGGATCTGCAATCGCCA (SEQ ID NO: 72). Cebador inverso:

CTTTTGATCTTGTTCACTTCTCCCTTCT (SEQ ID NO: 73). Sonda: 5'-carboxifluoresceína (FAM)-TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCTGCACT-tetrametilcarboxirrodamina (TAMRA)-3' (SEQ ID NO: 74). La amplificación y la detección se realizan con un instrumento ABI Prism 7900HT o 7500 (Applied Biosystems). Se define un valor de ciclo umbral (Ct) para cada muestra como el número de ciclo en el que la señal fluorescente se vuelve detectable por primera vez por encima de un umbral establecido. Entonces, se determinan los equivalentes de UFP para cada muestra basándose en una curva patrón de Ct frente al logaritmo del número de copias definido de ARN viral.

Resultados

La rata algodónera como modelo se ha usado ampliamente en el estudio de la patogenia e inmunidad de VRS debido a las muchas similitudes entre la enfermedad inducida por VRS en ratas algodóneras y seres humanos. Dos paralelismos importantes son la eficacia de los anticuerpos neutralizantes y la histopatología pulmonar potenciada asociada con la vacunación con VRS inactivado con formalina. Las ratas algodóneras también son más susceptibles a la infección con VRS que otros animales pequeños tales como los ratones.

Para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas de subunidades de F de VRS, se vacunaron grupos de ratas algodóneras hembra por vía intramuscular con diversas dosis de trómeros (F de VRS-deleción de péptido de fusión-trunc) o rosetas (F de VRS-delp23-furdel-trunc, escindido), cada uno formulado con alumbre o MF59. En todos los casos, una sola inmunización fue suficiente para inducir anticuerpos tanto neutralizantes como específicos de F en el suero cuando se midió tres semanas después de la primera vacunación (3wp1). A todas las ratas algodóneras se les administró una inmunización de refuerzo homóloga tres semanas después de la primera, y esto dio como resultado un aumento significativo de IgG específica de F y anticuerpo neutralizante cuando se midieron dos semanas más tarde (2wp2). En general, la inmunogenicidad de las rosetas fue igual o mayor que la de los trómeros, la formulación de MF59 mejoró los títulos más que la formulación de alumbre y dosis más altas de proteína produjeron títulos más altos, aunque hubo algunas excepciones.

Para determinar la capacidad protectora de las vacunas de subunidades, todas las ratas algodóneras se infectaron cuatro semanas después de la segunda vacunación con VRS por vía nasal y se midió la carga viral en el pulmón cinco días después mediante un ensayo de placas. En todos los casos, la vacunación de subunidades confirió protección frente a la exposición, ya que las cargas virales pulmonares en ratas algodóneras vacunadas fueron más de tres órdenes de magnitud inferiores a las de los animales de control no inmunizados, pero expuestos.

Tabla 4: Títulos de IgG en suero específica de F

Suero recogido	Dosis de proteína (µg)	Título de IgG en suero específica de F ^a			
		alumbre		MF59	
		trómero	roseta	trómero	roseta
3wp1	10	20276	36841	10251	22415
	1	18341	20802	3712	28610
	0,1	2698	6896	1065	8293
2wp2	10	103670	97174	130016	156144
	1	142331	102405	177441	299501
	0,1	11581	34354	50238	111099

^a título medio geométrico para ratas algodóneras individuales (7-8 por grupo)
 El inmunógeno de trómero fue F de VRS-deleción de péptido de fusión-trunc
 El inmunógeno de roseta fue F de VRS-delp23-furdel-trunc, escindido.

Tabla 4A: Título de virus en pulmón 5 días después de la exposición a VRS^a

vacunación	Dosis de proteína (µg)	Título de virus ^b
ninguna	-	822760
trómero/alumbre	10	546
	1	636
	0,1	903
roseta/alumbre	10	305
	1	341
	0,1	548
trómero/MF59	10	360

	1	301
	0,1	456
roseta/MF59	10	244
	1	257
	0,1	716

^aExposición intranasal con 1×10^5 unidades formadoras de placa (ufp) de VRS Long
^b ufp/gramo de pulmón 5 días después de la exposición
Títulos medios geométricos de 7-8 ratas algodóneras individuales/grupo.
Si un animal individual tenía un título de <203 (límite de detección), se le asignó un título de 100

Tabla 5: Título de neutralización en suero de VRS

Suero recogido	Dosis de proteína (μ g)	Título de neutralización en suero de VRS ^a			
		alumbre		MF59	
		trímero	roseta	trímero	roseta
3wp1	10	628	1050	578	229
	1	208	633	165	205
	0,1	57	200	51	65
2wp2	10	3669	4015	3983	3436
	1	3369	2844	5728	3940
	0,1	744	1902	2414	2093

^a Títulos de neutralización de reducción de sincitios del 60 %
Título medio geométrico para dos conjuntos de 3-4 ratas algodóneras por grupo

5 Ejemplo 7 – Vacuna de ARN de VRS

Síntesis de ARN

El ADN de plásmido que codifica el replicón de alfavirus (figura 4, SEQ ID NO: 77) sirvió como molde para la síntesis de ARN *in vitro*. Para estos experimentos, se usó la glucoproteína de fusión de superficie de longitud completa de VRS (F de VRS) (figura 4). Tras la administración de los replicones a células eucariotas, se tradujo el ARN de cadena positiva para producir cuatro proteínas no estructurales, que juntas replicaron el ARN genómico y transcribieron abundantes ARNm subgenómicos que codifican el producto génico heterólogo. Debido a la falta de expresión de las proteínas estructurales del alfavirus, los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) en el sentido de 5' del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del ARN de replicón *in vitro* y la ribozima del virus de la hepatitis delta (VHD) inmediatamente en el sentido de 3' de la cola de poli(A) genera el extremo 3' correcto a través de su actividad de autoescisión.

Después de la linealización del ADN del plásmido en el sentido de 5' de la ribozima del VHD con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcritos colaterales *in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN derivada del bacteriófago T7 o SP6. Las transcripciones se realizaron durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM (ARN polimerasa de SP6) de cada uno de los nucleósidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion, Austin, TX). Después de la transcripción, se digirió el molde de ADN con ADNasa TURBO (Ambion, Austin, TX). El ARN de replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. Al ARN sin caperuza se le añadió la caperuza postranscripcionalmente con enzima de adición de caperuza de vaccinia (VCE) usando el sistema de adición de caperuza ScriptCap m⁷G (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) tal como se explica resumidamente en el manual de usuario. El ARN con caperuza añadida postranscripcionalmente se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasas. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo la densidad óptica a 260 nm. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante.

Formulación de nanopartículas lipídicas (liposomas) RV01(01)

Se sintetizó 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DlinDMA) usando un procedimiento publicado previamente [Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 107: 276-287 (2005)]. Se adquirió 1,2-diaestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC) de Genzyme. Se obtuvo colesterol de Sigma-Aldrich (St. Lois, MO). Se obtuvieron 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio) (PEG DMG 2000), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (sal de amonio) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Se prepararon disoluciones madre de lípidos recientes en etanol. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11,8 mg de DSPC, 27,8 mg de colesterol y 8,07 mg de PEG DMG 2000 y se disolvieron en 7,55 ml de etanol. La disolución madre de lípidos recién preparada se agitó suavemente a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Entonces, se añadieron 755 µl de la disolución madre a 1,245 ml de etanol para producir una disolución madre de lípidos de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípido se usó para formar LNP con 250 µg de ARN a una razón de N:P (nitrógeno con respecto a fosfato) de 8:1. El nitrógeno protonable en DlinDMA (el lípido catiónico) y los fosfatos en el ARN se usan para este cálculo. Se supuso que cada µg de molécula de ARN autorreplicante contenía 3 nmoles de fosfato aniónico, se supuso que cada µg de DlinDMA contenía 1,6 nmoles de nitrógeno catiónico. También se preparó una disolución de trabajo de 2 ml de ARN a partir de una disolución madre de ~ 1 µg/µl en tampón citrato 100 mM (pH 6) (Teknova, Hollister, CA)). Se enjuagaron tres viales de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) con disolución RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, CA) y se lavaron con abundante agua MilliQ antes de su uso para descontaminar los viales de ARNasa. Uno de los viales se usó para la disolución de trabajo de ARN y los otros para recoger las mezclas de lípidos y ARN (tal como se describe a continuación). Las disoluciones de ARN y lípidos de trabajo se calentaron a 37 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en jeringas con conexión de Luer de 3 cm³ (BD Medical, Franklin Lakes, NJ). Se cargaron 2 ml de tampón citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cm³. Las jeringas que contenían el ARN y los lípidos se conectaron a una mezcladora en T (PEEK™, unión de DI de 500 µm, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA) usando tubos de FEP ([etileno-propileno fluorado] de 2 mm de DI × 3 mm de, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA). La salida de la mezcladora en T también eran tubos de FEP (2 mm de DI × 3 mm). La tercera jeringa que contenía el tampón citrato se conectó a un trozo separado de tubo (2 mm de DI × 3 mm de DE). Entonces, todas las jeringas se accionaron a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando una bomba de jeringa (kdScientific, modelo n.º KDS-220, Holliston, MA). Las salidas de los tubos se situaron para recoger las mezclas en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). Se sacó la barra de agitación y se permitió que la disolución de etanol/acuosa se equilibrara a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla en una jeringa de 5 cm³ (BD Medical), que estaba conectada a un trozo de tubo de FEP (2 mm de DI × 3 mm de DE, IDEX Health Science, Oak Harbor, WA) y en otra jeringa de 5 cm³ conectada a una longitud igual de tubo de FEP, se cargó una cantidad igual de tampón citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se accionaron a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando la bomba de jeringa y se recogió la mezcla final en un vial de vidrio de 20 ml (mientras se agitaba). A continuación, la mezcla recogida de la segunda etapa de mezclado (liposomas) se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que se une a y elimina moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Antes de hacer pasar los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente a través de la membrana Mustang 4 ml de NaOH 1 M, 4 ml de NaCl 1 M y 10 ml de tampón citrato 100 mM (pH 6). Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37 °C antes del paso a través del filtro Mustang. A continuación, los liposomas se concentraron hasta 2 ml y se dializaron frente a 10-15 volúmenes de IX PBS (de Teknova) usando el sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) antes de recuperar el producto final. El sistema de TFF y las membranas de filtración de fibras huecas se adquirieron de Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA) y se usaron según las directrices del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibras huecas de polisulfona (número de pieza P/N: XIAB-100-20P) con un corte de tamaño poro de 100 kD y 8 cm² de área de superficie. Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron hasta la concentración de ARN requerida con IX PBS (de Teknova).

Método de preparación de la emulsión catiónica 17 (CNE17)

Se obtuvieron escualeno, trioleato de sorbitán (Span 85) y monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80) de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Se adquirió 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) de Lipoid (Ludwigshafen, Alemania). Se prepararon nanoemulsiones catiónicas (CNE) de manera similar al MF59 cargado tal como se describió anteriormente con modificaciones menores, Ott, *et al.* Journal of Controlled Release, 79 (1-3): 1-5 (2002)). En resumen, los componentes solubles en aceite (es decir, escualeno, Span 85, lípidos catiónicos, tensioactivos lipídicos) se combinaron en un vaso de precipitados, los componentes lipídicos se disolvieron en cloroformo (CHCl₃) o diclorometano (DCM). La disolución de lípidos resultante se añadió directamente al aceite más Span 85. Se permitió que el disolvente se evaporara a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana extractora antes de combinar la fase acuosa y homogeneizar la muestra usando un homogeneizador IKA T25 a 24K RPM con el fin de proporcionar una materia prima homogénea. Las emulsiones primarias se hicieron pasar de tres a cinco veces a través de un homogeneizador Microfluidizer M110S o M110PS con un serpentín de enfriamiento de baño de hielo a una presión de homogeneización de aproximadamente 15 k – 20 k PSI (Microfluidics, Newton, MA). Las muestras de lote de 20 ml se retiraron de la unidad y se almacenaron a 4 °C. La tabla a continuación describe la composición de CNE17.

Tabla 6: Composición de CNE17

CNE	Lípido catiónico (+)	mg/ml +lípido	Tensioactivo	Escualeno	Tampón/agua
CNE17	DOTAP (en DCM)	1,40	SPAN 85 al 0,5 %, Tween 80 al 0,5 %	4,3 %	Tampón citrato 10 mM pH 6,5

Complejación de ARN

Se calculó el número de nitrógenos en disolución a partir de la concentración de lípidos catiónicos, DOTAP, por ejemplo, tiene 1 nitrógeno que puede protonarse por molécula. La concentración de ARN se usó para calcular la cantidad de fosfato en disolución usando una estimación de 3 nmoles de fosfato por microgramo de ARN. Variando la cantidad de ARN:lípido, puede modificarse la razón de N/P. El ARN se complejó con CNE17 a una razón de nitrógeno/fosfato (N/P) de 10:1. Usando estos valores, el ARN se diluyó hasta la concentración adecuada en agua libre de ARNasa y se añadió directamente a un volumen igual de emulsión mientras se agitaba con vórtex ligeramente. Se permitió que la disolución reposara a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Una vez complejada, la disolución resultante se diluyó hasta la concentración requerida antes de su administración.

Electroporación

La electroporación fue un método muy eficaz para la administración de vacunas de ADNp y se usó esta técnica para administrar ARN autorreplicante. Los ratones se anestesiaron con isoflurano, se afeitaron al ras ambas patas traseras para exponer el área de la extremidad que iba a tratarse. Se inyectó una dosis de 30 μ l de vacuna en el músculo de la pantorrilla de la extremidad posterior usando una jeringa de insulina de 1/2 cm^3 . El músculo se sometió a electroporación usando el sistema de administración de ADN Elgen® (Inovio, San Diego). Los parámetros del instrumento son los siguientes: 60 V, 2 pulsos de 60 ms cada uno. Se administró otra dosis de manera similar a la segunda extremidad, seguido por electroporación.

Partículas de replicón viral (VRP)

Para comparar las vacunas de ARN con los enfoques tradicionales de vectores de ARN para lograr la expresión *in vivo* de antígenos o genes indicadores, se utilizaron partículas de replicón viral (*viral replicon* particles, VRP) producidas en células BHK mediante los métodos descritos por Perri *et al.* En este sistema, los replicones de antígeno (o gen indicador) consistían en replicones quiméricos de alfavirus (VCR) derivados del genoma del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) modificados por ingeniería genética para que contuvieran las secuencias terminales 3' (UTR 3') del virus Sindbis y una señal de empaquetamiento (PS) del virus Sindbis (véase la figura 2 de Perri *et al.*). Estos replicones se empaquetaron en VRP sometidos a electroporación conjunta en células de riñón de cría de hámster (BHK) junto con ARN auxiliares defectuosos que codifican los genes de la cápside y glucoproteína del virus Sindbis (véase la figura 2 de Perri *et al.*). Entonces, los VRP se recogieron y se titularon mediante métodos convencionales y se inocularon en animales en fluido de cultivo u otros tampones isotónicos. Perri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, Romero RE, Tang Z, Bin Q, Dubensky TW, Jr. *et al.* (2003) An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *J Virol* 77: 10394-10403.

Vacuna de subunidades de trímero de F de VRS

El trímero de F de VRS es una proteína recombinante que comprende el ectodominio de F de VRS con una delección de la región del péptido de fusión que impide la asociación con otros trímeros. El constructo resultante forma un trímero homogéneo, tal como se observa mediante cromatografía de exclusión molecular, y tiene un fenotipo esperado consecuente con una conformación de F de posfusión, tal como se observa mediante microscopía electrónica. La proteína se expresó en células de insecto y se purificó en virtud de la etiqueta HIS en fusión con el extremo C terminal del constructo seguido por cromatografía de exclusión molecular usando técnicas convencionales. La muestra de proteína resultante presenta una pureza superior al 95%. Para la evaluación *in vivo* de la vacuna de subunidades de F, se adsorbieron 100 μ g/ml de proteína de trímero en 2 mg/ml de alumbre usando tampón histidina 10 mM, pH 6,3 y se ajustó la isotonicidad con cloruro de sodio hasta 150 mM. La proteína de subunidades de F se adsorbió sobre alumbre durante la noche con agitación suave a 2-8 °C. El pH y la osmolalidad de la vacuna final se fijaron como objetivo a 6,5-7,5 y 240-360 mOsm/kg. La vacuna se caracterizó por la adsorción de proteínas mediante SDS-PAGE (Invitrogen Corporation, EE. UU.) y por el contenido de endotoxinas mediante el ensayo LAL (Charles River Laboratories, EE. UU.). La vacuna se mezcló por inversión suave antes de la inmunización.

Estudios de inmunogenicidad murinos

Se inmunizaron grupos de 10 ratones BALB/c hembra de 8-10 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 20 gramos el día 0 y el día 21 con tomas de sangre los días 14, 35 y 49. Todos los animales recibieron inyecciones en el cuádriceps de las dos patas traseras obteniendo cada una un volumen equivalente (50 μ l por sitio) para un total de 100 μ l de vacuna para administrar una dosis de antígeno de 10 μ g. Cuando se requirió la medición de las respuestas de células T, se recogieron los bazoos el día 35 o 49.

Vacunación y exposición de ratas algodonerías

Se obtuvieron ratas algodonerías hembra (*Sigmodon hispidus*) de Harlan Laboratories. Todos los experimentos fueron aprobados y se realizaron según el Comité de Uso y Cuidado de Animales de Novartis. Se inmunizaron grupos de animales por vía intramuscular (i.m., 100 μ l) con las vacunas indicadas los días 0 y 21. Se recogieron muestras de suero 2 semanas después de cada inmunización. Se expuso a los animales inmunizados o de control sin vacunar por vía intranasal (i.n.) con 1×10^5 UFP de VRS 4 semanas después de la inmunización final. La recogida de sangre y la

exposición a VRS se realizaron bajo anestesia con isoflurano al 3 % usando un vaporizador de precisión.

Ensayos de función de células T de ratón

5 Ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares

Se agruparon de dos a cinco bazos de ratones BALB/c vacunados de manera idéntica y se prepararon suspensiones de células individuales para cultivo. Se establecieron dos cultivos estimulados con antígeno y dos cultivos no estimulados para cada conjunto de esplenocitos. Los cultivos estimulados con antígeno contenían 1×10^6 esplenocitos, péptido F de VRS 85-93 (1×10^{-6} M), péptido F de VRS 249-258 (1×10^{-6} M), péptido F de VRS 51-66 (1×10^{-6} M), AcM anti-CD28 (1 mcg/ml) y brefeldina A (1:1000). Los cultivos no estimulados no contenían péptidos F de VRS y, por lo demás, eran idénticos a los cultivos estimulados. Después de cultivar durante 6 horas a 37 °C, se procesaron los cultivos para inmunofluorescencia. Se lavaron las células y luego se tiñeron con anticuerpos monoclonales (AcM) anti-CD4 y anti-CD8 marcados con fluorescencia. Se lavaron las células de nuevo y luego se fijaron con Cytofix/cytoperm durante 20 minutos. Entonces, las células fijadas se lavaron con tampón de lavado Perm y luego se tiñeron con AcM marcados con fluorescencia específicos para IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-5. Las células teñidas se lavaron y luego se analizaron en un citómetro de flujo LSR II. Se usó el software FlowJo para analizar los datos adquiridos. Los subconjuntos de células T CD4+8- y CD8+4- se analizaron por separado. Para cada subconjunto en una muestra dada, se determinó el % de células positivas para citocinas. Se calculó el % de células T específicas de antígeno F de VRS como la diferencia entre el % de células positivas para citocinas en los cultivos estimulados con antígeno y el % de células positivas para citocinas en los cultivos no estimulados. Se determinaron los límites de confianza del 95 % para el % de células específicas de antígeno utilizando métodos convencionales (Statistical Methods, 7ª edición, G.W. Snedecor y W. G. Cochran).

25 Ensayo de citocinas secretadas

Los cultivos para el ensayo de citocinas secretadas fueron similares a los del ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares excepto porque se omitió la brefeldina A. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo después de un cultivo durante la noche a 37 °C y se analizaron para detectar múltiples citocinas utilizando kits de citocinas Th1/Th2 de ratón de Meso Scale Discovery. Se determinó la cantidad de cada citocina por cultivo a partir de curvas patrón producidas usando citocinas recombinantes purificadas suministradas por el fabricante.

ELISA específico de F de VRS

Se sometieron a ensayo muestras de suero individuales para detectar la presencia de IgG específica de F de VRS mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Se recubrieron placas de ELISA (MaxiSorp de 96 pocillos, Nunc) durante la noche a 4 °C con F de VRS purificado 1 μ g/ml (delp23-furdel-trunc no escindido) en PBS. Después del lavado (PBS con Tween-20 al 0,1 %), se bloquearon las placas con tampón de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1,5 horas a 37 °C. Entonces, se lavaron las placas, se añadieron diluciones en serie de suero en diluyente de ensayo (PBS con Tween-20 al 0,1 % y suero de cabra al 5 %) de ratas algodóneras experimentales o de control, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C. Después del lavado, se incubaron las placas con IgG de pollo anti-rata algodónera conjugada con peroxidasa del rábano (HRP) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluida 1:5.000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se lavaron las placas y se añadieron a cada pocillo 100 μ l de disolución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 μ l de H_3PO_4 1 M, y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas. Para cada muestra de suero, se generó un gráfico de densidad óptica (DO) frente al logaritmo de la dilución de suero inversa mediante regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución de suero inversa a una DO de aproximadamente 0,5 (normalizada a un patrón, sueros agrupados de ratas algodóneras infectadas con VRS con un título definido de 1:2500, que se incluyó en cada placa).

Ensayo de microneutralización

Se sometieron a prueba muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante una prueba de neutralización de reducción de placas (PRNT). Se añadieron diluciones en serie de dos veces de suero HI (en PBS con el 5 % de HI-FBS) a un volumen igual de VRS Long titulado previamente para dar aproximadamente 115 UFP/25 μ l. Se incubaron mezclas de suero/virus durante 2 horas a 37 °C y el 5 % de CO₂ para permitir que se produjera la neutralización del virus y luego se inocularon 25 μ l de esta mezcla (que contenía aproximadamente 115 UFP) en pocillos duplicados de células HEp-2 en placas de 96 pocillos. Después de 2 horas a 37 °C y el 5 % de CO₂, se recubrieron las células con metilcelulosa al 0,75 %/EMEM el 5 % de HI-FBS y se incubaron durante 42 horas. Se determinó el número de partículas de virus infecciosas mediante la detección de la formación de sincitios mediante inmunotinción seguido por recuento automático. El título de neutralización se define como el inverso de la dilución de suero que produce una reducción de al menos el 60 % en el número de sincitios por pocillo, en relación con los controles (sin suero).

65 Carga viral

Se determinó la carga viral en el pulmón mediante ensayo de placas. Específicamente, se recogieron los pulmones 5 días después de la infección con VRS y se colocó un lóbulo derecho en 2,5 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con sacarosa al 25% y se rompió con un homogeneizador de tejidos. Los sobrenadantes
 5 libres de células de estas muestras se almacenaron a -80 °C. Para el ensayo de virus infeccioso, se inocularon diluciones de homogeneizado de pulmón clarificado (en PBS con el 5 % de suero bovino fetal inactivado con calor, HI-FBS) en monocapas de células HEp-2 confluentes en un volumen de 200 µl/pocillo de una placa de 12 pocillos. Después de 2 horas con agitación suave periódica (37 °C, el 5 % CO₂), se retiró el inóculo y se recubrieron las células
 10 con 1,5 ml de agarosa SeaPlaque al 1,25 % (Lonza) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Lonza) suplementado con el 5 % de HI-FBS, glutamina y antibióticos. Después de 3-4 días de incubación, se recubrieron las células de nuevo con 1 ml de agarosa al 1,25 % en EMEM (Sigma) que contenía rojo neutro al 0,1 % (Sigma). Las placas se contaron un día después con la ayuda de una caja de luz.

Patología pulmonar de ratas algodonerías

Cinco días después de la exposición a VRS, se recogieron los pulmones y se recogieron 4 lóbulos de cada animal y se fijaron con formalina tamponada neutra (NBF) al 10 % mediante instilación intratraqueal suave seguido por fijación por inmersión. Los tejidos se procesaron de manera rutinaria para preparar secciones teñidas con hematoxilina y eosina para el examen microscópico. Los hallazgos se evaluaron usando una modificación de los criterios publicados
 20 previamente [Prince GA, *et al.*, 2001] para los siguientes parámetros: peribronquiolitis, alveolitis, bronquitis, infiltrados celulares perivasculares y neumonitis intersticial. Las lesiones se clasificaron en una escala semicuantitativa de 4 puntos. El cambio mínimo (+) contenía uno o unos pocos focos pequeños; el cambio leve (++) estaba compuesto por focos de tamaño pequeño a medio; el cambio moderado (+++) contenía focos frecuentes y/o de tamaño moderado; y el cambio marcado (+++++) mostró focos extensos a confluentes que afectaban a la mayoría/todo el tejido.

Ejemplo 7

A – Estudio de exposición a VRS de ratas algodonerías (CRIS14)

El replicón A317, que expresa la glucoproteína de fusión de superficie de VRS (F de VRS), se usó para este experimento. A ratas algodonerías (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con ARN autorreplicante desnudo (A317, 1 µg o 10 µg), ARN autorreplicante formulado en LNP [RV01(01), A317, 0,1 µg o 1 µg], VRP (5×10⁶ UI) que expresan F de VRS, subunidad de trímero de F/alumbre (10 µg) o vacuna de VRS inactivado con formalina (5200 ufp de FI). Se recogió
 35 suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Se expuso a todos los animales con 1×10⁵ ufp de VRS por vía intranasal el día 49 y se recogieron los pulmones el día 54 (5dpc) para determinación de la carga viral y la patología pulmonar.

Resultados

Tabla 7: Títulos de IgG en suero específica de F el día 14 y 35

vacuna	dosis	IgG específica de F	IgG específica de F
		2wp1	2wp2
A317	10 µg	198	1599
A317	1 µg	78	526
CNE17	1 µg	408	4918
CNE17	0,1 µg	325	2512
RV01(01)	1 µg	531	4351
RV01(01)	0,1 µg	134	1033
VRP	5×10 ⁶ UI	961	5864
Trímero de F/alumbre	10 µg	3526	111893
FI-VRS	5200 ufp de FI	17	2074
ninguna		5	5

Tabla 7. Títulos de IgG en suero específica de F de ratas algodonerías (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2), se expuso a todos los animales con 1×10⁵ ufp de VRS por vía intranasal el día 49. Se recogieron los pulmones el día 54 (5dpc) para la determinación de la carga viral y la patología pulmonar. Los datos se representan como títulos medios geométricos de 8 ratas algodonerías individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título

de <25 (límite de detección), se le asignó un título de 5.

Tabla 8: Títulos de neutralización en suero de VRS los días 14 y 35

vacuna	dosis	PRNT60	PRNT60
		2wp1	2wp2
A317	10 µg	78	240
A317	1 µg	58	70
CNE17	1 µg	91	269
CNE17	0,1 µg	63	145
RV01(01)	1 µg	103	667
RV01(01)	0,1 µg	46	130
VRP	5×10 ⁶ UI	149	683
Trímero de F/alumbre	10 µg	142	>5120
FI-VRS	5200 ufp de FI	28	38
ninguna		30	<20

5 Tabla 8. Títulos de neutralización en suero de VRS de ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se representan como títulos de neutralización de reducción de placas del 60 %. Títulos medios geométricos de 2 conjuntos de 4 ratas algodoneras por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de
10 detección), se le asignó un título de 5.

Tabla 9: Títulos de virus en pulmón 5 días tras la exposición a VRS

vacuna	dosis	ufp/g de pulmón
		5dpc
A317	10 µg	397
A317	1 µg	659
CNE17	1 µg	414
CNE17	0,1 µg	572
RV01(01)	1 µg	445
RV01(01)	0,1 µg	716
VRP	5×10 ⁶ UI	359
Trímero de F/alumbre	10 µg	190
FI-VRS	5200 ufp de FI	5248
ninguna (expuesto)		728618

15 Tabla 9: Títulos de virus en pulmón 5 días tras la exposición a VRS de ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se expuso a todos los animales con 1×10⁵ ufp de VRS por vía intranasal el día 49. Se recogieron los pulmones el día 54 (5dpc) para la determinación de la carga viral y la patología pulmonar. Los datos se representan como unidades formadoras de placa por gramo de pulmón tal como se determina mediante el ensayo de placas. Títulos medios geométricos de 8 ratas algodoneras
20 individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <200 (límite de detección), se le asignó un título de 100.

Tabla 10: Puntuaciones de alveolitis pulmonar 5 días tras la exposición a VRS

vacuna	dosis	n.º de ratas algodoneras con puntuación de alveolitis indicada				
		0	1	2	3	4
A3171	10 µg	8				
A3171	1 µg	8				
CNE17	1 µg	8				
CNE17	0,1 µg	7	1			

RV01(01)	1 µg	6	2	
RV01(01)	0,1 µg	8		
VRP	5×10 ⁶ UI	3	4	1
Trímero de F/alumbre	10 µg	7	1	
FI-VRS	5200 ufp de FI	1	4	3
ninguna (expuesto)		5	3	

Tabla 10. Alveolitis pulmonar 5 días tras la exposición a VRS de ratas alodoneras (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se expuso a todos los animales con 1×10⁵ ufp de VRS por vía intranasal el día 49. Se recogieron los pulmones el día 54 (5dpc) para la determinación de la carga viral y la patología pulmonar. Se clasificaron las lesiones en una escala semicuantitativa de 4 puntos. El cambio mínimo (1) contenía uno o unos pocos focos pequeños; el cambio leve (2) estaba compuesto por focos de tamaño pequeño a medio; el cambio moderado (3) contenía focos frecuentes y/o de tamaño moderado; y el cambio marcado (4) mostró focos extensos a confluentes que afectaban a la mayoría/todo el tejido.

Conclusiones

Uno objetivo de este estudio fue determinar la inmunogenicidad y la capacidad protectora del ARN de replicón en el modelo de VRS de rata alodonera. Otro objetivo fue evaluar el efecto de las formulaciones de liposomas y CNE17 sobre la inmunogenicidad y eficacia de la vacuna. El ARN de replicón no formulado indujo anticuerpos neutralizantes de VRS e IgG específica de F en suero después de una vacunación, y esta respuesta se reforzó mediante una segunda vacunación. Las formulaciones de liposomas y CNE17 fueron igualmente eficaces en este modelo, reforzando los títulos de IgG específica de F a 1 µg de ARN de replicón aproximadamente 8 veces y los títulos de neutralización en 4-10 veces (CNE17 y liposomas, respectivamente) después de la segunda vacunación. Todas las vacunas de ARN de replicón proporcionaron protección frente a una exposición nasal a VRS, reduciendo la carga viral pulmonar en más de 3 órdenes de magnitud cuando se midió 5 días más tarde. La magnitud y la capacidad protectora de la respuesta inmunitaria generada por 1 µg de ARN de replicón formulado con liposomas estuvo dentro de dos veces la respuesta provocada por 5×10⁶ VRP. La subunidad de trímero con adyuvante de alumbre provocó los títulos de ELISA de IgG anti-F totales más altos, provocó los títulos de neutralización más altos y provocó el grado más alto de protección frente a los títulos de VRS en el pulmón con la exposición de cualquiera de las preparaciones de vacuna sometidas a prueba en este estudio.

Ejemplo 7B – Estudio de inmunogenicidad de F de VRS (10-1001)

El replicón A317, que expresa la glucoproteína de fusión de superficie de VRS (F de VRS), se usó para este experimento. A ratones BALB/c, 10 animales por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µl por pata) los días 0 y 21 con VRP que expresan F de VRS (1×10⁶ UI), ARN autorreplicante desnudo (A317, 1 µg), ARN autorreplicante administrado usando electroporación (A317, 10 µg), ARN autorreplicante formulado en liposomas [RV01(01), A317, 0,1 µg o 1 µg] y ARN autorreplicante formulado con CNE17 (A317, 0,1 µg o 1 µg). Se recogió suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1), 35 (2wp2) y 49 (4wp2). Se recogieron los bazo de 5 ratones por grupo el día 49 (4wp2) para el análisis de células T.

Resultados

Tabla 11: Títulos de IgG en suero específica de F el día 14

	1 µg de A317	0,1 µg de RV01(01)	1 µg de RV01(01)	0,1 µg de CNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6 UI de VRP
	529	14385	19299	2429	3373	5	6041
	1530	10713	19170	2060	4417	88	4912
	2734	12756	13860	2012	1927	964	12923
	2503	11546	17352	1887	3597	7235	7075
	5539	15300	22094	3174	5731	2558	6829
	1033	14072	21213	3904	2852	5105	4885
	5110	18274	17915	1481	3739	9806	3680
	1106	7873	15659	2345	4904	2787	9813
	1493	17175	6669	3084	3824	2576	8631
	3456	19730	13259	2497	3004	1858	6314

GMT	1980	13731	15903	2398	3590	1180	6685
-----	------	-------	-------	------	------	------	------

Tabla 11. (10-1001) Títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 10 animales por grupo, 14 días después de la vacunación intramuscular. Los datos se representan como títulos para ratones individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección), se le asignó un título de 5.

Tabla 12: Títulos de IgG en suero específica de F el día 35

	1 µg de A317	0,1 µg de RV01(01)	1 µg de RV01(01)	0,1 µg de CNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6 UI de VRP
	958	128208	227021	48079	8473	14612	813045
	12518	191729	212911	17589	58556	22805	365485
	4839	315786	303987	8522	12053	32156	961601
	10128	218147	335071	10985	20395	24090	349215
	18451	225622	155893	30801	51514	31053	297526
	9805	182693	519162	13372	26348	18105	207652
	19154	185342	169332	5137	80686	23918	1580066
	4490	82744	489441	47173	21014	9091	900889
	14674	190010	131361	78232	61076	21006	822285
	15223	553164	254500	24135	25499	9835	587121
GMT	8532	201892	253687	20767	29111	19117	579033

10 Tabla 12. (10-1001) Títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis de anticuerpos el día 35 (2wp2). Los datos se representan como títulos para ratones individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección), se le asignó un título de 5.

15 Tabla 13: Títulos de IgG en suero específica de F el día 49

	1 µg de A317	0,1 µg de RV01(01)	1 µg de RV01(01)	0,1 µg de CNE17	1 µg de CNE17	10 µg de A317 + EP	1E6 UI de VRP
	1248	140407	133787	52747	34245	30388	366771
	12441	155669	182995	29352	128030	20768	209400
	4967	203059	211020	10857	17016	53763	360615
	14536	134253	488698	28800	57250	28373	191475
	31556	370726	158816	44613	76576	34318	139148
	13815	184738	185184	20314	42357	35736	63839
	20495	141644	103026	4546	101445	34611	192101
	4800	76711	312096	27476	47285	10138	177858
	19159	143275	139811	68386	55865	23958	130218
	26836	479594	230331	24360	52871	13624	174378
GMT	10947	177168	194350	24891	53615	25888	180420

20 Tabla 13. (10-1001) Títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis de anticuerpos los días 49 (4wp2). Los datos se representan como títulos para ratones individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección), se le asignó un título de 5.

Tabla 14: Títulos de neutralización en suero de VRS el día 35

	A317, 1 µg	RV01(01) 0,1 µg	RV01(01) 1 µg	CNE17 0,1 µg	CNE17 1 µg	VRP 1E6 UI
	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2
	NA	143	106	NA	NA	265

	NA	272	62	NA	NA	73
	NA	294	<40	NA	NA	77
	NA	814	334	NA	NA	140
	NA	67	86	NA	NA	290
	NA	420	125	NA	NA	134
	NA	<40	566	NA	NA	466
	NA	104	292	NA	NA	127
	NA	241	<40	NA	NA	75
	NA	223	44	NA	NA	77
GMT	NA	176	96	NA	NA	139

Tabla 14: (10-1001) Títulos de neutralización en suero de VRS de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis el día 35 (2wp2). Los datos se representan como títulos de neutralización de reducción de placas del 60 % de ratones individuales y el título medio geométrico de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <40 (límite de detección), se le asignó un título de 20. NA = no sometido a ensayo.

Tabla 15: Títulos de neutralización en suero de VRS el día 49

	A317, 1 µg	RV01(01) 0,1 µg	RV01(01) 1 µg	CNE17 0,1 µg	CNE17 1 µg	VRP 1E6 UI
	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2
	<40	194	82	<40	<40	161
	<40	272	165	<40	70	64
	<40	142	<40	<40	<40	126
	<40	881	442	<40	76	151
	<40	61	108	42	57	194
	<40	426	156	52	<40	123
	<40	78	814	<40	<40	1033
	<40	<40	291	173	<40	174
	<40	246	103	<40	<40	122
	<40	574	396	<40	<40	76
GMT	<40	231	215	29	29	155

Tabla 15: (10-1001) Títulos de neutralización en suero de VRS de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis el día 49 (4wp2). Los datos se representan como títulos de neutralización de reducción de placas del 60 % de ratones individuales y el título medio geométrico de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <40 (límite de detección), se le asignó un título de 20. NA = no sometido a ensayo.

Tabla 16: T respuestas celulares el día 49

Respuestas de células T CD4 esplénicas 4wp2	Células T esplénicas CD4+CD8-: % positivas para citocinas y específicas para péptido F51-66 de VRS			
	IFNγ+	IL2+	IL5+	TNFα+
VRP 1E6 UI	0,07 ± 0,06	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,02	0,10 ± 0,04
1 µg de A317	0,00 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
RV01(01) 1 µg	0,04 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,00 ± 0,01	0,09 ± 0,03
RV01(01) 0,1 µg	0,06 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,10 ± 0,03
CNE17 1 µg	0,00 ± 0,05	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,02
CNE17 0,1 µg	0,00 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,02
10 µg de vA317 + EP	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,03
ninguna	0,04 ± 0,06	0,00 ± 0,05	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,01

Tabla 16. (10-1001) Frecuencias de células T esplénicas CD4+ específicas de F de VRS el día 49 (4wp2). Se muestra la frecuencia neta positiva para citocinas (específicas de antígeno) (%) \pm semi-intervalo de confianza del 95 %. Las frecuencias netas mostradas en **negrita** indican respuestas estimuladas que eran de manera estadísticamente significativa > 0.

Tabla 17: Respuestas de células T el día 49

Respuestas de células T CD8 esplénicas 4wp2	Células T esplénicas CD8+CD4-: % positivas para citocinas y específicas para los péptidos F de VRS F85-93 y F249-258			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 UI	3,48 \pm 0,29	1,21 \pm 0,18	-0,03 \pm 0,05	3,31 \pm 0,28
1 μ g de A317	0,74 \pm 0,15	0,46 \pm 0,11	-0,03 \pm 0,04	0,70 \pm 0,14
RV01(01) 1 μ g	3,69 \pm 0,28	1,43 \pm 0,18	-0,01 \pm 0,04	3,44 \pm 0,27
RV01(01) 0,1 μ g	2,52 \pm 0,23	1,10 \pm 0,15	0,03 \pm 0,03	2,31 \pm 0,22
CNE17 1 μ g	1,25 \pm 0,17	0,60 \pm 0,12	0,01 \pm 0,03	1,15 \pm 0,16
CNE17 0,1 μ g	0,89 \pm 0,15	0,49 \pm 0,11	-0,03 \pm 0,04	0,83 \pm 0,14
10 μ g de A317 + EP	0,85 \pm 0,15	0,53 \pm 0,11	0,01 \pm 0,04	0,72 \pm 0,15
ninguna	0,01 \pm 0,07	0,00 \pm 0,05	-0,02 \pm 0,05	0,02 \pm 0,06

Tabla 17. (10-1001) Frecuencias de células T esplénicas CD8+ específicas de F de VRS el día 49 (4wp2). Se muestra la frecuencia neta positiva para citocinas (específicas de antígeno) (%) \pm semi-intervalo de confianza del 95 %. Las frecuencias netas mostradas en **negrita** indican respuestas estimuladas que eran de manera estadísticamente significativa > 0.

Conclusiones

La formulación de liposomas mejoró significativamente la inmunogenicidad, tal como se determinó por el aumento de los títulos de IgG específica de F (aumento de 8-30 veces), los títulos de neutralización y las respuestas de células T CD4 y CD8, en relación con el control de ARN desnudo. Sorprendentemente, los títulos de IgG específica de F y los títulos de neutralización para RV01(01) a ambas dosis de 0,1 y 1,0 μ g fueron equivalentes a la VRP (1×10^6 UI). Las respuestas de células T para la formulación de LNP fueron equivalentes a la dosis más alta de VRP (1×10^6 UI). La formulación del ARN autorreplicante con CNE17 mejoró significativamente la inmunogenicidad, tal como se determinó por el aumento de los títulos de IgG específica de F (aumento de 2-5 veces), los títulos de neutralización y las respuestas de células T CD4 y CD8, en relación con el control de ARN desnudo. La electroporación del ARN mejoró la inmunogenicidad en relación con el control de ARN desnudo, pero fue significativamente menor que la administración de liposomas.

Ejemplo 7C – Estudio de inmunogenicidad de F de VRS (10-1018)

El replicón A317, que expresa la glucoproteína de fusión de superficie de VRS (F de VRS), se usó para este experimento. A ratones BALB/c, 8 animales por grupo, se les administraron vacunaciones intramusculares bilaterales (50 μ l por pata) los días 0 y 21 con VRP que expresan F de VRS (1×10^6 UI), ARN autorreplicante desnudo (A306, 1, 0,1, 0,01 μ g) y ARN autorreplicante formulado en liposomas (RV01(01) usando el método 1 (A317, 10,0, 1,0, 0,1, 0,01 μ g). Se recogió suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1) y (2wp2). Se recogieron los bazo 5 ratones por grupo el día 49 (4wp2) para el análisis de células T.

Resultados

La formulación de liposomas RV01(01) tenía un diámetro de partícula promedio Z de 158 nm con un índice de polidispersidad de 0,14, la eficiencia de encapsulación era del 96 %. En las tablas 18 y 19 se muestran los títulos de IgG en suero específica de F el día 14 y 35 y en las tablas 20 y 21 se muestran las respuestas de células T el día 49.

Tabla 18: Títulos de IgG en suero específica de F el día 14 y 35

	VRP 1E6 UI		A317					
			1 μ g		0,1 μ g		0,01 μ g	
	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2
	6334	39539	772	4687	5	2334	143	1377
	1500	14895	5	142	5	161	5	333

	VRP 1E6 UI		A317					
			1 µg		0,1 µg		0,01 µg	
	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2
	5450	38252	109	2972	5	145	5	5
	1835	12831	5	3674	5	97	5	5
	2277	30326	5	5003	5	1077	5	175
	2818	33437	663	8258	221	457	5	5
	2405	22551	257	845	5	1558	5	456
	2137	19179	5	1765	5	5	5	180
GMT	2735	24427	41	2144	8	259	8	73

Tabla 18: (10-1018) Títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se representan como ratones individuales y los títulos medio geométricos de 8 ratas algodóneras individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 19: Títulos de IgG en suero específica de F el día 14 y 35

	RV01(01)							
	10 µg		1 µg		0,1 µg		0,01 µg	
	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2
	5880	82689	7255	45018	4072	22174	619	2872
	6126	42529	3009	22288	3974	27730	474	3603
	8069	76263	5385	23561	3272	15328	914	2692
	5966	108234	4148	53675	3968	24456	2011	11542
	8590	57912	4210	37004	4950	13014	903	4684
	7172	74162	2179	24179	2856	13694	1575	6720
	8072	122796	1640	5994	4073	17849	438	16514
	8706	83601	5725	28760	3797	17342	1058	13665
GMT	7235	77338	3783	25790	3826	18325	879	6235

Tabla 19: Continuación de 23A. (10-1018) Títulos de IgG en suero específica de F de ratones, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares los días 0 y 21. Se recogió suero para el análisis de anticuerpos los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se representan como animales individuales y los títulos medios geométricos (GMT) de 8 ratas algodóneras individuales por grupo. Si un animal individual tenía un título de <25 (límite de detección) se le asignó un título de 5.

Tabla 20: Respuestas de células T el día 49

Respuestas de células T esplénicas 4wp2	Células T esplénicas CD4+CD8-: % positivas para citocinas y específicas para péptido F51-66 de VRS			
	IFNγ+	IL2+	IL5+	TNFα+
VRP 1E6 UI	0,00 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,07 ± 0,03
1 µg de A317	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
0,1 µg de A317	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
0,01 µg de A317	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01
RV01(01), 10 µg	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,02
RV01(01), 1 µg	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,09 ± 0,02
RV01(01), 0,1 µg	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
RV01(01), 0,01 µg	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02
ninguna	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Tabla 20. Frecuencias de células T esplénicas CD4+ específicas de F de VRS el día 49 (Expt. 10-1018, 4wp2). Se muestra la frecuencia neta positiva para citocinas (específicas de antígeno) (%) \pm semi-intervalo de confianza del 95 %. Las frecuencias netas mostradas en **negrita** indican respuestas estimuladas que eran de manera estadísticamente significativa > 0.

5

Tabla 21: Respuestas de células T el día 49

Respuestas de células T esplénicas 4wp2	Células T esplénicas CD8+CD4-: % positivas para citocinas y específicas para los péptidos de F de VRS F85-93 y F249-258			
	IFN γ +	IL2+	IL5+	TNF α +
VRP 1E6 UI	2,45 \pm 0,21	0,58 \pm 0,10	0,00 \pm 0,01	2,64 \pm 0,21
1 μ g de A317	1,68 \pm 0,17	0,45 \pm 0,09	0,00 \pm 0,02	1,75 \pm 0,18
0,1 μ g de A317	0,21 \pm 0,07	0,08 \pm 0,04	0,01 \pm 0,02	0,30 \pm 0,08
0,01 μ g de A317	0,06 \pm 0,05	0,05 \pm 0,03	0,01 \pm 0,02	0,16 \pm 0,06
RV01(01), 10 μ g	3,32 \pm 0,23	0,69 \pm 0,11	0,00 \pm 0,02	3,90 \pm 0,25
RV01(01), 1 μ g	1,81 \pm 0,17	0,59 \pm 0,10	0,00 \pm 0,02	2,04 \pm 0,20
RV01(01), 0,1 μ g	0,91 \pm 0,12	0,32 \pm 0,07	0,00 \pm 0,01	1,06 \pm 0,14
RV01(01), 0,01 μ g	0,58 \pm 0,10	0,33 \pm 0,08	0,00 \pm 0,01	0,64 \pm 0,11
ninguna	0,01 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,05

Tabla 21. Frecuencias de células T CD8+ esplénicas específicas de F el día 49 (Expt. 10-1018, 4wp2). Se muestra la frecuencia neta positiva para citocinas (específicas de antígeno) (%) \pm semi-intervalo de confianza del 95 %. Las frecuencias netas mostradas en **negrita** indican respuestas estimuladas que eran de manera estadísticamente significativa > 0.

10

Conclusiones

15

La formulación de liposomas mejoró significativamente la inmunogenicidad, tal como se determinó por el aumento de los títulos de IgG específica de F y las frecuencias de células T, en relación con los controles de ARN desnudo. Los títulos de IgG específica de F y las frecuencias de células T CD8 para RV01(01) a la dosis de 10 μ g de ARN mejoraron en relación con el grupo de VRP (1×10^6 UI).

20

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

1. Fields Virology. 4ª edición, 2001.

25

2. Snell *et al.* (1997) Virus Genes 14:63-72.

3. Bembridge *et al.* (1999) J Virol 73: 10086-10094.

4. Li *et al.* (1998) J Exp Med 188:681-688

30

5. Patente estadounidense n.º 6.060.308.

6. Yin *et al.* (2006) Nature 439:38-45.

35

7. Kim *et al.* (2007) J Med Virol 79: 820-828.

8. Yin *et al.* (2005) Proc Natl Acad Sci USA. 102(26):9288-93.

9. Chen *et al.* (2004) J Virol 78:4508-16.

40

10. Yang *et al.* (2002) J Virol 76:4634-42.

11. Harbury *et al.* (1993) Science 262:1401-1407.

45

12. Stevens *et al.* (2004) Science 303:1866-70.

13. Burkhard *et al.* (2001) Trends Cell Biol 11:82-88.

14. Sección 5.5.2 de Proteins de Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).

15. Yu (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:1113-1129.
16. Muller *et al.* (2000) *Methods Enzymol* 328:261-282.
17. Beck y Brodsky (1998) *J Struct Biol* 122:17-29.
18. Lupas (1996) *Trends Biochem Sci* 21:375-382.
19. Adamson *et al.* (1993) *Curr Opin Biotechnol* 4:428-347.
20. Kammerer (1997) *Matrix Biol* 15:555-568.
21. Chao *et al.* (1998) *J Chromatog B Biomed Sci Appl* 715:307-329.
22. Arndt *et al.* (2002) *Structure* 10:1235-1248.
23. Liu & Lu (2002) *J Biol Chem* 277:48708-48713.
24. Documento WO2006/011060.
25. Sección 5.5.3 de Proteins de Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).
26. Zhang y Chen (1999) *J Biol Chem* 274:22409-22413.
27. Slovic *et al.* (2003) *Protein Sci* 12:337-348
28. Gardner y Dutch (2007) *J Virol* 81:8303-14.
29. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
30. Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
31. Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
32. Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
33. Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
34. Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
35. Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
36. Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
37. Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
38. Patente estadounidense n.º 6355271.
39. Documento WO00/23105.
40. Patente estadounidense n.º 5.057.540.
41. Documento WO96/33739.
42. Documento EP-A-0109942.
43. Documento WO96/11711.
44. Documento WO00/07621.
45. Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
46. Sjolander *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
47. Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.

48. Documento WO95/17211.
49. Documento WO98/42375.
50. Singh *et al* (2001) J Cont Release 70:267-276.
51. Documento WO99/27960.
52. Patente estadounidense n.º 6.090.406.
53. Patente estadounidense n.º 5.916.588.
54. Documento EP-A-0626169.
55. Documento WO99/52549.
56. Documento WO01/21207.
57. Documento WO01/21152.
58. Dyakonova *et al.* (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.
59. Documento FR-2859633.
60. Signorelli y Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.
61. Documento WO2004/064715.
62. De Libero *et al.* (2005) Nature Reviews Immunology 5:485-496
63. Patente estadounidense n.º 5.936.076.
64. Old *et al.*, J Clin Investig, 113:1631-1640
65. Documento US2005/0192248
66. Yang *et al.* (2004) Angew Chem Int Ed 43:3818-3822
67. Documento WO2005/102049.
68. Goffet *et al* (2004) Am Chem Soc 126:13602-13603
69. Documento WO03/105769.
70. Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
71. Documento WO90/14837.
72. Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
73. Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
74. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
75. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
76. Allison y Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
77. Hariharan *et al.* (1995) Cancer Res 55:3486-9.
78. Documento WO95/I 1700.
79. Patente estadounidense n.º 6.080.725.

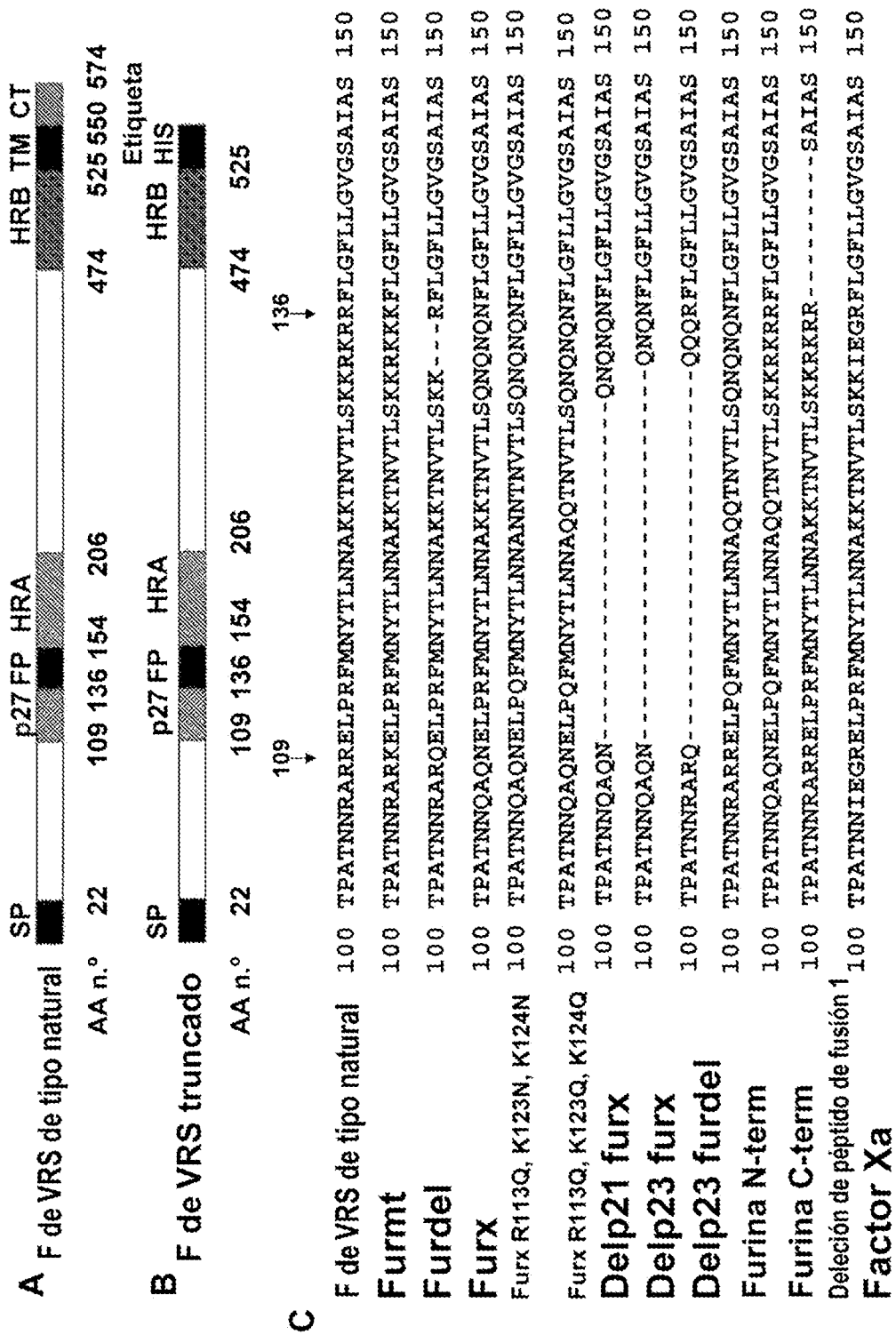
80. Documento WO2005/0971 81.
81. Tassignon *et al.* (2005) J Immunol Meth 305:188-98.
- 5 82. Myers *et al.* (1990) páginas 145-156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.
83. Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de la referencia 75.
- 10 84. Johnson *et al.* (1999) J Med Chem 42:4640-9.
85. Baldrick *et al.* (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413.
86. Patente estadounidense n.º 4.680.338.
- 15 87. Patente estadounidense n.º 4.988.815.
88. Documento WO92/15582.
- 20 89. Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:57 1-577.
90. Wu *et al.* (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83.
91. Vasilakos *et al.* (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74.
- 25 92. Patentes estadounidenses n.ºs 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
- 30 93. Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
94. Documento WO2004/060308.
95. Documento WO2004/064759.
- 35 96. Patente estadounidense n.º 6.924.271.
97. Documento US2005/0070556.
- 40 98. Patente estadounidense n.º 5.658.731.
99. Patente estadounidense n.º 5.011.828.
100. Documento WO2004/87 153.
- 45 101. Patente estadounidense n.º 6.605.617.
102. Documento WO02/18383.
- 50 103. Documento WO2004/018455.
104. Documento WO03/082272.
105. Documento WO2006/002422.
- 55 106. Johnson *et al.* (1999) BioorgMed Chem Lett 9:2273-2278.
107. Evans *et al.* (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.
- 60 108. Andrianov *et al.* (1998) Biomaterials 19:109-115.
109. Payne *et al.* (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
110. Thompson *et al.* (2003) Methods in Molecular Medicine 94:255-266.
- 65 111. Kandimalla *et al.* (2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400.

112. Documento WO02/26757.
113. Documento WO99/62923.
- 5 114. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
115. McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- 10 116. Documento WO98/40100.
117. Patente estadounidense n.º 6.207.646.
118. Patente estadounidense n.º 6.239.116.
- 15 119. Patente estadounidense n.º 6.429.199.
120. Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658.
- 20 121. Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
122. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
123. Documento WO01/95935.
- 25 124. Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
125. Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- 30 126. Documento WO03/035836.
127. Documento WO01/22972.
128. Thompson *et al.* (2005) *JLeukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.
- 35 129. Solicitud de patente británica GB-A-22202 11.
130. Documento WO94/21292.
- 40 131. Documento WO94/00153.
132. Documento WO95/17210.
- 45 133. WO96/26741.
134. Documento WO93/19780.
135. Documento WO03/011223.
- 50 136. Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-249 1.
137. Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- 55 138. Patente estadounidense n.º 6.586.409.
139. Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- 60 140. Documento US2005/0215517.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende una proteína F de VRS recombinante soluble en forma de un trímero que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en el que
5 (i) el primer dominio comprende el ectodominio F de VRS en su totalidad o en parte, y
(ii) el segundo dominio comprende un dominio de oligomerización heterólogo que es la secuencia de trimerización de fibritina de bacteriófago T4 ("foldon"),
10 en el que el ectodominio de F de VRS en su totalidad o en parte comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 23-525 de SEQ ID NO: 2; y
15 en donde la composición inmunogénica es para su uso como un medicamento.
2. La composición inmunogénica para su uso de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos el 90% de identidad con los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 23-525 de
20 SEQ ID NO: 2.
3. La composición inmunogénica para su uso de la reivindicación 2, en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos el 95% de identidad con los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 23-525 de
25 SEQ ID NO: 2.
4. La composición inmunogénica para su uso de la reivindicación 3, en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos el 98% de identidad con los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 23-525 de
30 SEQ ID NO: 2.
5. La composición inmunogénica para su uso de cualquier reivindicación anterior, en la que la secuencia de trimerización de la fibritina del bacteriófago T4 ("foldon") está representada por SEQ ID NO: 19.

Figura 1



f de V3S de tipo natural	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNAGKSTTN	-----	TM-C
Ent idealizada	488	FDASISQINEKINQILAFIRKID	ELLHNINAGKSTTNGSGDDDKSGSG	-----	TM-C
GCN Ent	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNDKIEELISKIVHIENEIARIKKLIGEGSGDDDDKSGSG	-----	TM-C
FacXa idealizado	488	FDASISQINEKINQILAFIRKID	ELLHNINAGKSTTNGSGGIEGRGSG	-----	TM-C
GCN Thr	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNDKIEELISKIVHIENEIARIKKLIGEGSGGIEGRGSGSG	-----	TM-C
Thr idealizada	488	FDASISQINEKINQILAFIRKID	ELLHNINAGKSTTNGSGGLVPRGSGSG	-----	TM-C
GCN Thr	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNDKIEELISKIVHIENEIARIKKLIGEGSGGLVPRGSGSG	-----	TM-C

TM-C = Dominio transmembrana + cola C-terminal
IMITTHIVIVILLSLAVGLLYCKARSTPTLSKDQLSGINNIAPSN
Ent = Sitio de escisión de enterocinasa - DDDDK
FacXa = Sitio de escisión de factor Xa - IEGR
Thr = Sitio de escisión de trombina - LVPR

Figura 2

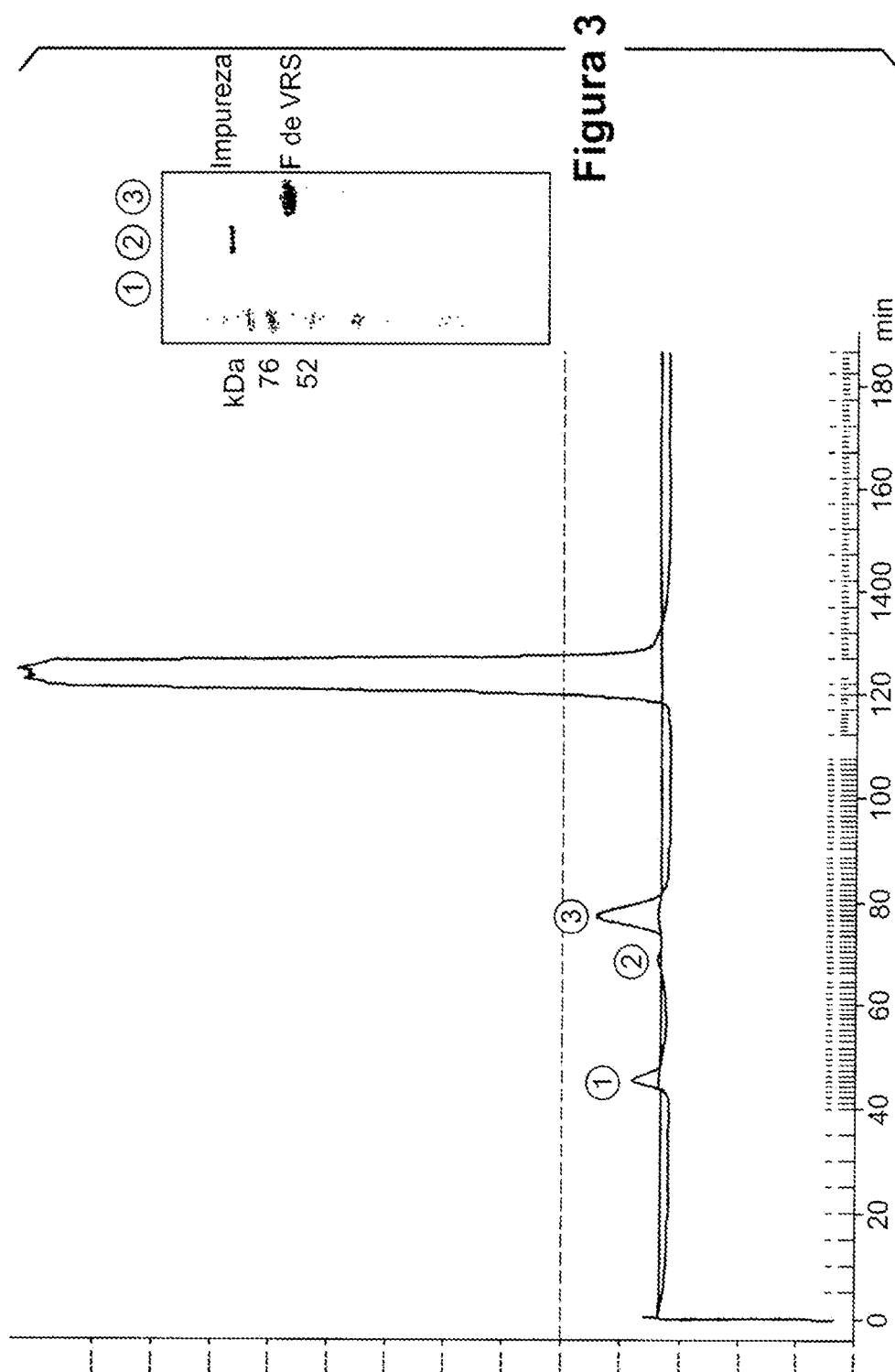


Figura 3

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA
 GGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTC
 ACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGG
 ACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAAGTATCA
 TTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAA
 AACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCTAGAGCGACC
 CTGACCTGGAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGT
 TTACCAGGATGTATACGCGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTC
 GCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACT
 CTACCAACTGGGCGGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGA
 GCGGTACAGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAAGAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCT
 GTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTCTACT
 TACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTGCGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAG
 AATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTC
 TTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAG
 CTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACCTGCT
 GGTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTAC
 CTTTGTCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAA
 GGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAAC
 ATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAAACAGCGATTTCCACTCATTCTGTGCTG
 CCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACA
 AGGAGCCGTACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGA
 GGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTG
 GAAGCCGATGTAGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAA
 AGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGAGGCTGTACTCAA
 GAGTGAAAAATTATCTTGATCCACCCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAA
 GGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGG
 ACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCA
 CCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAG
 CACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAG
 GGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
 CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAG
 AGCGCAGTACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACCTGTGCAGAAATTATAAGGGACG
 TCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAACA
 CCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGTCTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCC

FIG. 4A

ATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGT'TTT'TTAACATGATGTGCC
 TGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATT'TGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGT'TGCACTAA
 ATCTGTGACTTCGGTTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACT
 AAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAG
 GGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCT
 GACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAA
 CATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGA
 TAAAAAACTGACTGCCAAGTACCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA
 TGCCATCATGAGGCACATCTTGAGAGACCGGACCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGT
 TGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGTTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTG
 TGGATTATTTTGAACCGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTT
 TGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGG
 GATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACC
 CACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA
 TCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACAC
 CCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCTGTGAGCAAAATGAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTGGGGAAAAGT
 TGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGAGACCGGCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGA
 TTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATAC
 CATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATC
 TGAATCCCGCGGAACCTGTGTGAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGG
 TGCTATAGCGCGCAGTTCAAGTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTT
 CTGTTTGTATTCAATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGA
 CCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGA
 TATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTG
 TGCGGAGCGCTGTATAAGAAAT'TCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGAC
 TGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTATGCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGA
 AGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
 GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACC
 ATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAAT
 GACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTG
 ACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCA
 CAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGA
 AATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGC
 ATGAGCAGTATTAGGTGCAAAATGCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTT
 GCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAC

FIG. 4B

TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCT
 ATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCGTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGAAACACCACCGGTAG
 ACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAAC
 CGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGT
 TTGCTGTGCAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTAT
 CTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCT
 GGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGCAACGTGAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG
 TTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTGAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGACAA
 GAACACCGTCACTTGCAACCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAA
 TAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTGGTCTCGAGA
 ACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTTCGTAG
 CACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACA
 ACAAAAATCAGTAAGGCAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCTGTAT
 GCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGTAATTAACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTA
 ACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTTGCAAGG
 CCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCTGCATCCTGTTCTTTGTAT
 TCATCTAGTGTGAACCGTGCCCTTTTCAAGCCCCAAGGTGCGAGTGGAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAG
 AGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGG
 AGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCC
 TATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCCTTACGCGATCCAGAACACGCTCCAGAAGCTCCTGGCAG
 CTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTGCGCGGCCCTTTAA
 TGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGG
 CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAAATTAAGGACCAAAAAGCTGCTGCTCTTTTGCAG
 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGT
 GAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCG
 CTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCTGCTTCCGA
 ACATTCATACACTGTTTGATATGTGCGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGG
 GGATTGTGTTCTGGAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG
 TTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGACGACAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAA
 TTTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCTT
 CACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACGGCTAACCGGA
 TCACCATGTGCAGCATTGTTGGAGATGACAAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAG
 ACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTA
 TTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCTAAAA
 AGGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGTC

FIG. 4C

ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTA
 TGAAACCGTAGGAACCTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGC
 TACCTGAGAGGGGGCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCGACGCC
 ACCATGGAACCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCG
 CCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAG
 CGCCCTGCGGACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGTCCAACATCAAAGAAAACAAGTGC
 AACGGCACCGACGCCAAGGTGAACTGATCAAGCAGGAACCTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGC
 TGCAGCTGCTGATGAGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAGCTGCCCCGGTTCATGAA
 CTACACCCTGAACAACGCCAAGAAAACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTTGGGC
 TTCTCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATCGCCAGCGGGGTGGCCGTGTCCAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCG
 AGGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGAG
 CGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAG
 CAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAA
 TCACCCGGGAGTTACGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGA
 GCTGCTGTCCCTGATCAATGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAG
 ATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGC
 TGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACAC
 CAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACCGGGGCTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTG
 AGCTTCTTCCCCAAGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCC
 TGACCCTGCCCTCCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCAT
 GACCTCCAAGACCGACGTGAGCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAG
 ACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGA
 GCAACAAGGGCGTGGACACCGTGAGCGTGGGCAACACACTGTACTACGTGAATAAGCAGGAAGGCAAGAG
 CCTGTACGTGAAGGGCAGGCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCGCCAGCGACGAGTTCGAC
 GCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCCGGAAGAGCGACGAGCTGC
 TGCACAATGTGAATGCCGGCAAGAGCACCACCAATATCATGATCACCACAATCATCATCGTGATCATTGT
 GATCCTGCTGTCTCTGATTGCCGTGGGCCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCCGCAGACCCCTGTGACCCTG
 TCCAAGGACCAGCTGTCCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAGTGAAGTCTAGACGGCGCGCCACCC
 AGCGGCCGCATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGCGATTGGCATGCCGCCTTAA
 AATTTTATTTTATTTTCTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAAATATTTCAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGA
 AGGAGGACGCACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCCACGTTTAAACCAGCTCCAATTCGCCCTATAG
 TGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC
 CAACTTAATCGCCTTGAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAGATC
 GCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC

FIG. 4D

GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTC
 TTCCCTTCTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
 TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCC
 ATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTTC
 CAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGG
 CCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTAC
 AATTTAGGTGGCACCTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCTAAATACATTCAA
 ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
 TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTGTTTTGCTCACCCA
 GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATC
 TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACCTTTAAAGT
 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTAT
 TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
 AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
 ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
 GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC
 GCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
 GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
 TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT
 GATTAAGCATTTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTT
 TAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTT
 CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCA
 ACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGT
 GGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
 CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
 GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
 CCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
 GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
 TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
 AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTC
 TCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGA

FIG. 4E

GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCT
CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCA
AGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCACGCGTAATACGACTCACTA
TAG

FIG. 4F

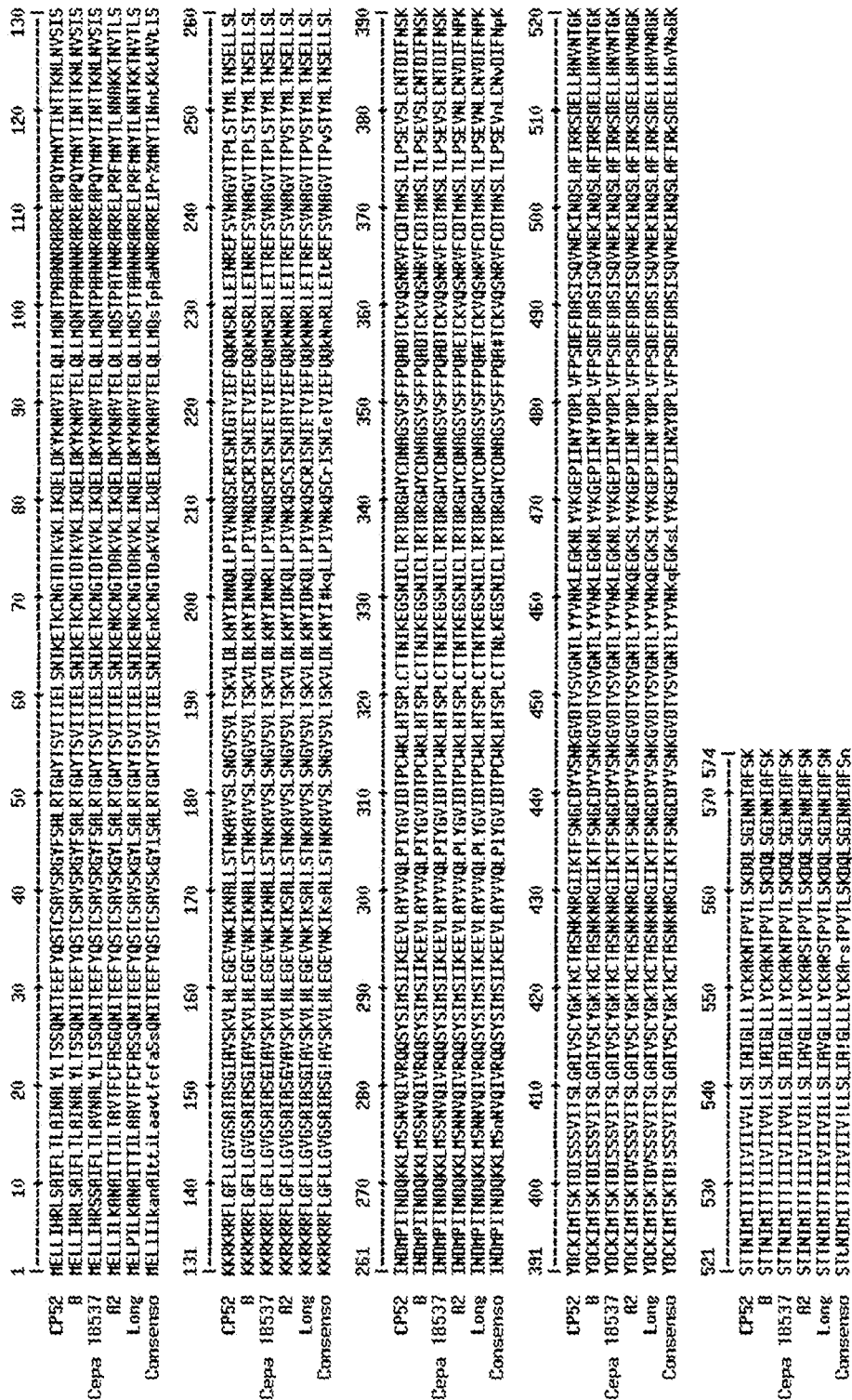


Figura 5

Figura 6: Cromatogramas de purificación por SEC típicos de antígenos F de VRS seleccionados

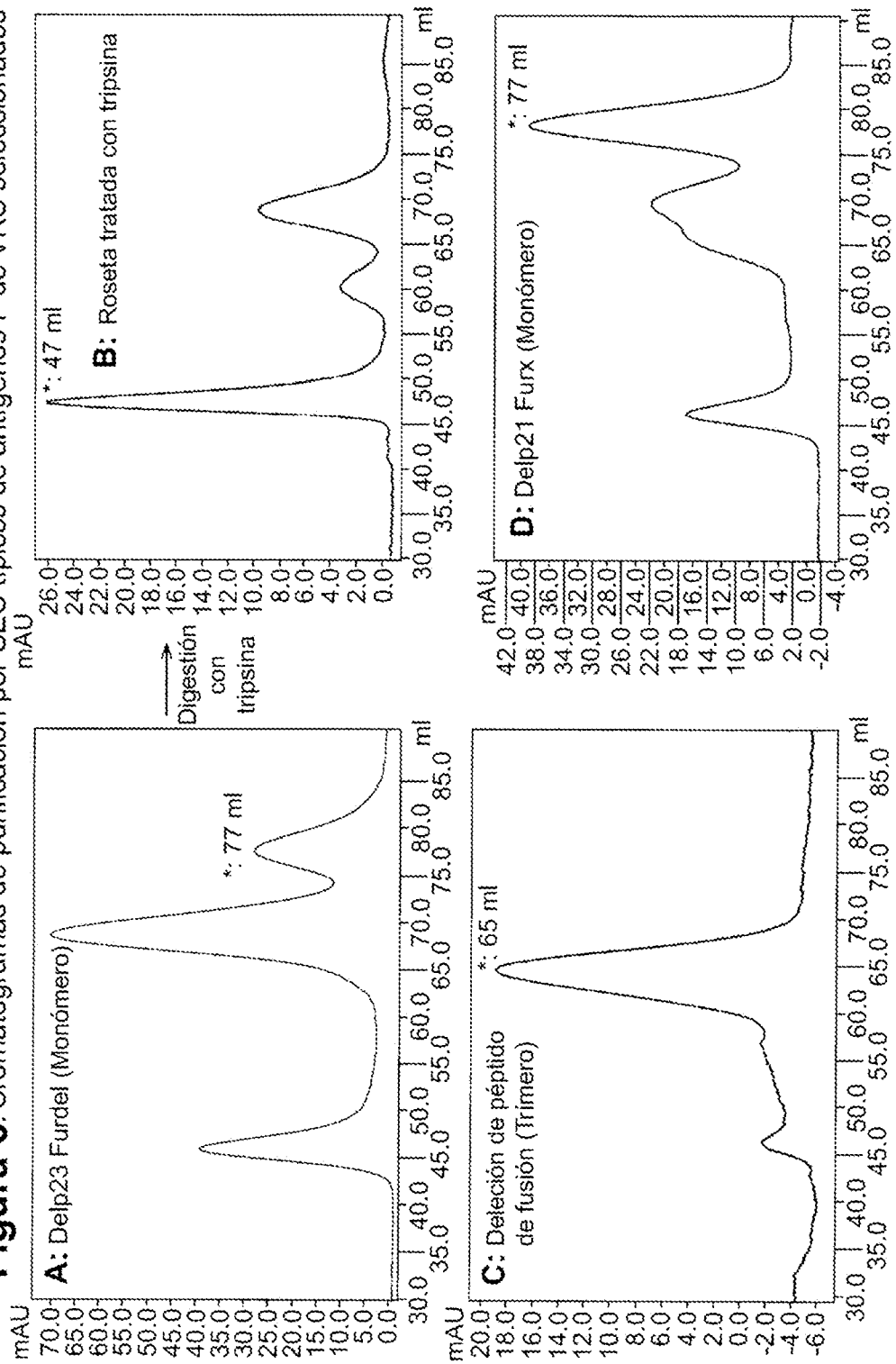


Figura 7: Análisis de EM y SDS-PAGE de antígeno F de VRS

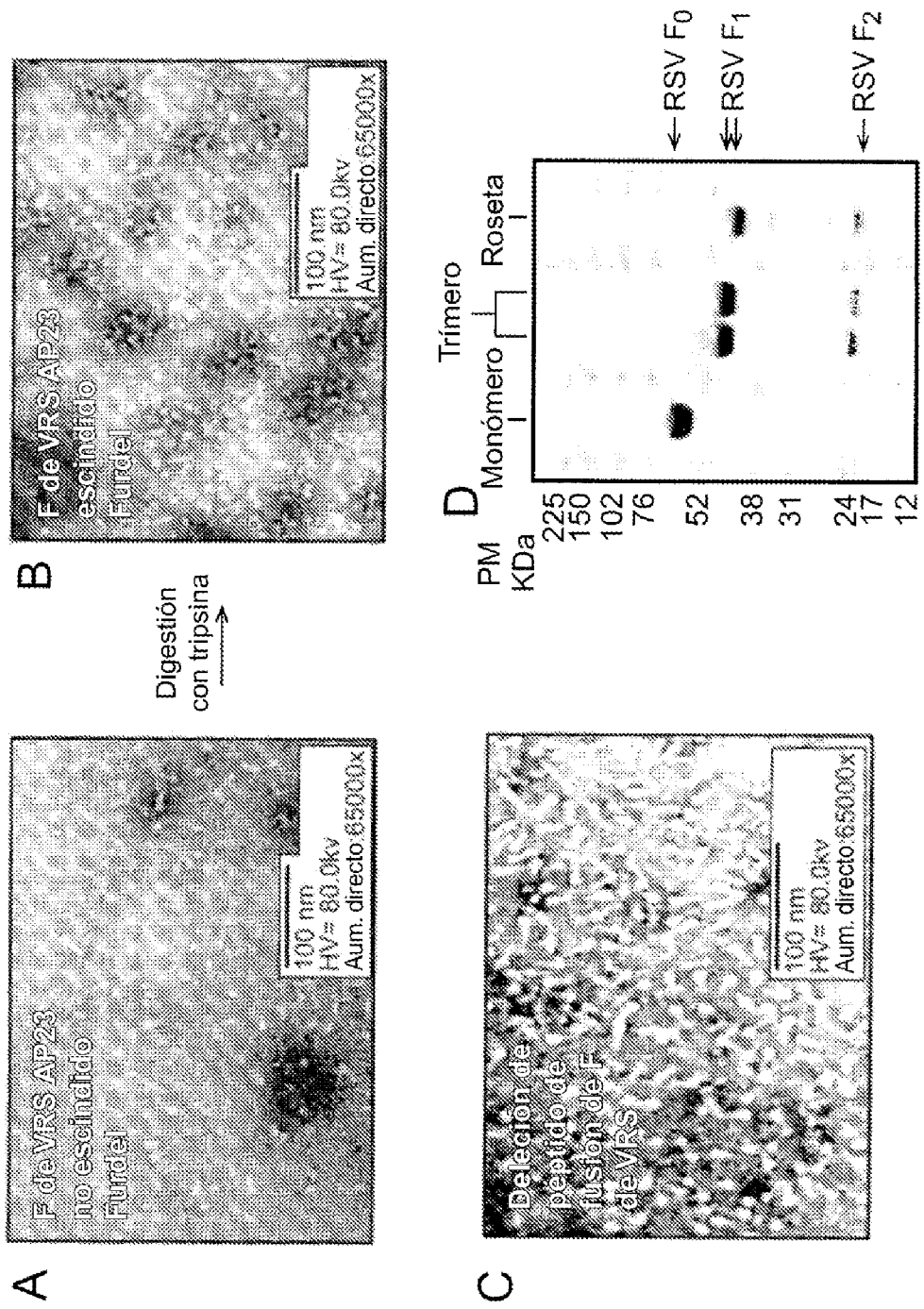


Figura 8: Inmunogenicidad de subunidades de F de VRS en ratas aldoneras

