(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 981 623**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/135 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026714**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160463**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14775224 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024 EP 2970398**

(54) Título: **Proteínas F de RSV de prefusión y su uso**

(30) Prioridad:

13.03.2013 US 201361780910 P
15.03.2013 US 201361798389 P
23.07.2013 US 201361857613 P
09.08.2013 US 201361863909 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2024

(73) Titular/es:
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer, National Institutes of Health, 6701 Rockledge Drive, Suite 700, MSC 7788
Bethesda, Maryland 20892-7788, US

(72) Inventor/es:
BOYINGTON, JEFFREY;
GEORGIEV, IVELIN, STEFANOV;
PANCERA, MARIE;
SOTO, CINQUE;
SRIVATSAN, SANJAY;
STEWART-JONES, GUILLAUME;
KWONG, PETER, D.;
GRAHAM, BARNEY, S.;
MCLELLAN, JASON, S.;
JOYCE, MICHAEL, GORDON;
KANEKIYO, MASARU;
ZHANG, BAOSHAN;
CHEN, LEI;
CHEN, MAN;
CHUANG, GWO-YU;
GORMAN, JASON;
YANG, YONGPING;
ZHOU, TONGQING;
SASTRY, MALLIKA y
OFEK, GILAD

(74) Agente/Representante:
FERNÁNDEZ POU, Felipe

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas F de RSV de prefusión y su uso

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica prioridad de las Solicitudes Provisionales de EE.UU. Nº 61/780.910, presentada el 13 de marzo de 2013, Nº 61/798,389, presentada el 15 de marzo de 2013, Nº 61/857.613, presentada el 23 de julio de 2013 y Nº 61/863.909, presentada el 9 de agosto de 2013.

CAMPO

Esta divulgación se refiere a polipéptidos, polinucleótidos, composiciones y métodos de su uso, para la inducción y detección de una respuesta inmune al virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés).

ANTECEDENTES

El virus sincitial respiratorio (RSV) es un virus de ARN de cadena negativa, no segmentado, con envoltura en la familia Paramyxoviridae, género *Pneumovirus*. Este es la causa más común de la bronquiolitis y neumonía entre los niños en su primer año de vida. El RSV también causa infecciones repetidas incluyendo la enfermedad del tracto respiratorio inferior severa, que se puede presentar en cualquier edad, especialmente entre la gente de edad avanzada o aquellos con sistemas cardíacos, pulmonares o inmunes comprometidos. La inmunización pasiva se utiliza actualmente para prevenir la enfermedad grave provocada por la infección por RSV, especialmente en niños con prematuridad, displasia broncopulmonar o enfermedad cardiaca congénita. El tratamiento actual incluye la administración de un anticuerpo neutralizante de RSV, Palivizumab (SYNAGIS®; MedImmune, Inc.), que une un epítopo conformacional, lineal, de 24 aminoácidos en la proteína de Fusión (F) de RSV.

En la naturaleza, la proteína F de RSV se expresa inicialmente como un solo precursor de polipéptido, designado F_0. F_0 se trimeriza en el retículo endoplasmático y se procesa por una proteasa similar a furina celular en dos sitios conservados, generyo los polipéptidos F_1, F_2 y Pep27. El polipéptido Pep27 se escinde y no forma parte de la proteína F madura. El polipéptido F_2 proviene de la porción N-terminal del precursor F_0 y se enlaza al polipéptido F_1 por la vía de dos enlaces disulfuro. El polipéptido F_1 proviene de la porción C-terminal del precursor F_0 y ancla la proteína F madura en la membrana a través de un dominio de transmembrana, el cual se enlaza a una cola citoplásmica de ~24 aminoácidos. Tres protómeros del heterodímero F_2-F_1 se ensamblan para formar una proteína F madura, la cual adopta una conformación de prefusión metaestable que se activa para someterse a un cambio conformacional que fusiona las membranas virales y de la célula diana. Debido a su papel obligatorio en la entrada de RSV, la proteína F de RSV es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes y el sujeto del desarrollo de vacuna; sin embargo, de manera similar a otros antígenos de RSV, los esfuerzos previos para desarrollar una vacuna a base de proteína F de RSV han demostrado no tener éxito.

Margo *et al.* (2012) PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109x, nº 8 pp 3089-3094 describe anticuerpos que se unen a la proteína RSV humana. McLellan *et al.* (2013) SCIENCE, Vol. 340, nº 6136, pp 1113-1117 describen la estructura de la proteína F de RSV de prefusión.

COMPENDIO

La invención se define en las reivindicaciones. Las realizaciones y/o los ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención. Cualesquiera referencias en la descripción a métodos de tratamiento se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o para diagnóstico.

Como se describe en la presente, se dilucidó la estructura tridimensional de la proteína F de RSV en su conformación de prefusión. La divulgación revela por primera vez los detalles al nivel atómico de la conformación de prefusión de F de RSV, que presenta un sitio antigénico único ("sitio antigénico Ø") en su ápice distal a la membrana. Utilizyo la estructura tridimensional de F de prefusión como una guía, se diseñaron y se construyeron formas estabilizadas de F de prefusión (antígenos "PreF"), y se utilizaron para generar respuestas inmunes neutralizantes de RSV muchas veces más gryes que las logradas con los inmunógenos basados en proteína F de RSV previos, y que proporcionan protección contra la estimulación de RSV en modelos de animales. Los antígenos PreF se pueden utilizar, por ejemplo, tanto como vacunas potenciales contra el RSV como en calidad de moléculas de diagnóstico.

Se describen proteínas F de RSV recombinantes, aisladas que se estabilizan en una conformación de prefusión, así como moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas F de RSV recombinantes. En varias realizaciones, las proteínas F de RSV recombinantes se estabilizan en una conformación de prefusión mediante

sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L (en comparación con una proteína F de RSV como se recoge en una de SEQ ID NOs: 1-184), de modo que las proteínas F de RSV se pueden unir específicamente al anticuerpo D25 específico de prefusión. En varias realizaciones, la proteína F de RSV recombinante comprende un sitio ∅ antigénico que comprende los residuos 62-69 y 196-209 de una secuencia de proteína F de RSV, tal como SEQ ID NO: 370. En algunas realizaciones, el inmunógeno se puede unir específicamente al anticuerpo después de que el inmunógeno se incube a 20 °C en solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico durante al menos 24 horas en ausencia del anticuerpo. En realizaciones adicionales, el inmunógeno puede formar una población homogénea cuyo se disuelve en solución acuosa, en donde por lo menos 90 % del inmunógeno en la población se puede unir específicamente al anticuerpo específico de prefusión.

En algunas realizaciones, los polipéptidos F_2 y F_1 comprenden las posiciones 62-69 y 196-209 de F de RSV, respectivamente, y el polipéptido F_2 comprende o consiste en 8-84 residuos de las posiciones 26-109 de F de RSV, y los polipéptidos F_1 comprenden o consisten en 14-393 residuos de las posiciones 137-529 de F de RSV, en donde las posiciones de F de RSV corresponden a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido F_0 de referencia recogido como SEQ ID NO: 124.

En varias realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L que estabilizan la proteína en la conformación de prefusión, por ejemplo, que estabilizan la porción distal a la membrana de la proteína F (incluyendo la región N-terminal del polipéptido F1) en la conformación de prefusión. Por ejemplo, la sustitución de aminoácido puede introducir un enlace disulfuro no natural o puede ser una sustitución de aminoácido de relleno de la cavidad. En varias realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones S155C y S290C que forman un enlace disulfuro no natural que estabiliza la proteína en una conformación de prefusión; es decir, en una conformación que específicamente se une a uno o más anticuerpos de especificación de prefusión, y/o presenta un sitio antigénico, tal como el sitio antigénico Ø, que está presente en la conformación de pre- pero no de post-fusión de la proteína F de RSV. En realizaciones adicionales, la proteína F de RSV recombinante puede incluir, además, una sustitución F, L, W, Y, H o M en la posición 190, posición 207, o las posiciones 190 y 207. En un ejemplo no limitante, la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L (a las que se alude en la presente como "DSCav1").

En realizaciones adicionales, la proteína F de RSV recombinante puede incluir una o más modificaciones al extremo C del polipéptido F1 (tales como truncamientos y sustituciones de aminoácido) que, junto con las modificaciones que estabilizan la región distal a la membrana del polipéptido F, pueden incrementar la estabilización de la proteína F recombinante en la conformación de prefusión. Modificaciones ejemplares incluyen el enlace del polipéptido F_1 a un dominio de trimerización (tal como un dominio foldon) o la introducción de uno o más residuos de cisteína en la región C-terminal del polipéptido F1 (por ejemplo, en las posiciones 512 y 513) que pueden formar enlaces disulfuro de inter-protómero.

El antígeno PreF se puede incluir en una nanopartícula de proteína, o en una partícula similar a viral. También se describen moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos PreF. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV de una cadena sencilla.

Realizaciones adicionales incluyen una proteína de armazón de epítopo que incluye las posiciones 62-69 y 196-209 de F de RSV, o un permutante circular de la misma, enlazado a una proteína de armazón heterólogo, en donde la proteína de armazón de epítopo se une específicamente a un anticuerpo específico de prefusión.

También se proporcionan composiciones que incluyen los antígenos PreF, nanopartícula de proteína, molécula de ácido nucleico o vector. La composición puede ser una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto, y también puede estar contenida en una forma de dosificación unitaria. Las composiciones pueden incluir, además, un adyuvante.

Se describen composiciones inmunogénicas para uso en métodos para generar una respuesta inmune en un sujeto que lo necesite, como son composiciones inmunogénicas para uso en métodos para tratar, inhibir o prevenir una infección de RSV en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones de los métodos, a un sujeto, tal como un sujeto humano o bovino, se le administra una cantidad eficaz de un antígeno descrito y/o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno descrito. En algunas realizaciones, los métodos incluyen la administración de una composición inmunogénica que incluye un adyuvante seleccionado para inducir una respuesta inmune desviada de Th1 en un sujeto. En realizaciones adicionales, los métodos incluyen una inmunización prime boost (cebado-refuerzo), utilizo las proteínas F de RSV del subtipo A humano y subtipo B humano estabilizadas en una conformación de prefusión con las modificaciones descritas en la presente. Se describen métodos para detectar o aislar un anticuerpo de unión de RSV en un sujeto infectado con RSV. En algunas realizaciones, las proteínas F de RSV recombinantes se pueden utilizar para detectar y cuantificar anticuerpos objetivo en una respuesta de suero policlonal.

Lo anterior y otros objetivos, características y ventajas de las realizaciones resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras acompañantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las **FIGs. 1A-1C** son un conjunto de gráficas y un diagrama que ilustra la neutralización de RSV, el reconocimiento de glicoproteína F, y la estructura cristalina del anticuerpo humano D25 en complejo con el trímero F de RSV de prefusión. La conformación de prefusión de F de RSV es metaestable, y cuyo se expresa en una forma soluble fácilmente adopta el estado de post-fusión; un número de anticuerpos potentes, que incluyen D25, se unen a un sitio antigénico recientemente revelado en la parte superior de la glicoproteína F de prefusión. (**A**) Neutralización de RSV por anticuerpos que incluyen palivizumab, el anticuerpo profiláctico aprobado por la FDA para prevenir la enfermedad de RSV grave. (**B**) Ensayo inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA) que mide la unión del anticuerpo a la glicoproteína F de post-fusión. (**C**) Estructura del trímero F de D25-RSV en representaciones de cinta y de superficie molecular. Un protómero del trímero de glicoproteína F se muestra como cintas. Las superficies moleculares se muestran para los otros dos protómeros F. El Fab de D25 enlazado al protómero F mostrado en cintas también se exhibe en la representación de cinta, con la cadena pesada sombreada en gris oscuro y la cadena ligera sombreada en gris claro. Los otros Fabs de D25 se sombrean de la misma manera, pero se muestran en representación de superficie.

Las **FIGs. 2A y 2B** son un conjunto de diagramas y una secuencia alineada con la estructura secundaria de RSV que ilustra el reordenamiento estructural de F de RSV. Para mediar en la entrada célula-virus, la glicoproteína F de RSV pasa de una conformación de prefusión metaestable a una conformación de post-fusión estable. (**A**) Estructuras de prefusión y post-fusión. Las imágenes exteriores exhiben estructuras triméricas de prefusión (izquierda) y de post-fusión (derecha), sombreadas lo mismo que en la FIG. 1C. Un glicano complejo, mostrado como palitos, se modela en cada uno de los tres sitios de glicosilación *N*-enlazados encontrados en la proteína madura. Las imágenes interiores exhiben un protómero F de RSV individual en representación de cinta. (**B**) La secuencia F de RSV y la estructura secundaria. Los sitios de glicosilación N-enlazados son resaltados por triángulos negros, los sitios antigénicos son marcados y las flechas hacia abajo indican la posición de los sitios de escisión de furina. Las estructuras secundarias se muestran abajo de la secuencia (SEQ ID NO: 370), con cilindros que representan hélices α y flechas que representan cadenas β. Los residuos desordenados o perdidos están indicados por una "X"; los residuos que se mueven por encima de 5 Å entre las conformaciones de prefusión y post-fusión se muestran con sombra gris y están encuadrados.

Las **FIGs. 3A-3C** muestran un conjunto de diagramas y un alineamiento de secuencia que ilustra la interfase F de RSV con D25. El anticuerpo D25 se une a un epítopo cuaternario que abarca dos protómeros en el ápice del trímero F de prefusión. (**A**) Acercamiento de la interfase entre D25 y F de RSV. Las cadenas laterales de los residuos F que interactúan con D25 están marcadas y se muestran como palitos. Los átomos de oxígeno se sombrean en gris claro y los átomos de nitrógeno se sombrean en gris oscuro. Los enlaces hidrógeno se representan como líneas discontinuas. Las dos imágenes se relacionan por una rotación de 90° alrededor del eje vertical. (**B**) Posición y conformación del epítopo D25 en las moléculas F de prefusión y post-fusión. Se muestran los residuos F de RSV en la interfase D25. La polaridad de α4 y $\alpha 5_{post}$ indicada con flechas, con los fragmentos N- y C-terminales indicados. (**C**) conservación de secuencia de los residuos F en regiones reconocidas por D25. Los aminoácidos en el subtipo B de RSV humano (hRSV/B) o en RSV bovino (bRSV) que difieren de hRSV/A están subrayados. El ectodominio se define como los residuos 26-109 y 137-524 de F.

Las **FIGs. 4A-4D** son series de gráficas e imágenes digitales concernientes al sitio antigénico Ø. Los anticuerpos neutralizantes de RSV altamente efectivos fijan como objetivo un sitio en el ápice distal a la membrana del trímero F de prefusión. (**A**) La capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de D25 a las células infectadas con RSV se midió como una función de la concentración de anticuerpo. (**B**) El análisis de los complejos F/Fab de RSV mediante microscopía electrónica de tinción negativa: (Izquierda) Reproyección de un corte de 12 Å a través de la estructura cristalina de F de RSV + Fab de D25 filtrado a una resolución de 10 Å y cortado para incluir la cavidad del trímero F. (Parte Media) Promedio alineado de 263 partículas de F de RSV + Fab de D25. (Derecha) Promedio alineado de 550 partículas de F de RSV + Fab de AM22. La barra de escala en el panel medio es 50 Å. (**C**) Inhibición de la fusión y (**D**) actividad de inhibición de unión para los anticuerpos que fijan como objetivo el sitio antigénico Ø y los anticuerpos específicos de F que fijan como objetivo otros sitios antigénicos. Para el ensayo de inhibición de unión, se utilizó heparina como un control positivo.

La **FIG. 5** muestra un diagrama esquemático que ilustra los métodos utilizados para expresar complejos de F de RSV y D25. Los plásmidos que expresan Fd F(+) de RSV (círculo F), la cadena ligera de D25 (círculo L) y la cadena pesada de D25 (con o sin un codón de parada en la región de bisagra, círculo H) se transfectaron simultáneamente en células HEK293 en suspensión. Alternativamente, el plásmido Fd F(+) de RSV podría ser transfectado, con Fab o IgG de D25 purificado añadido a las células 3 horas de post-transfección. Los mejores rendimientos se obtuvieron al expresar simultáneamente F y Fab de D25 (~1.0 mg de complejo purificado por litro de células).

La **FIG. 6** muestra un conjunto de diagramas de cinta que ilustran la comparación de F de RSV unido a D25 a F de PIV5 de prefusión. La representación de cinta de Fd F(+) de RSV unida a D25 (izquierda) y F de PIV5-GCNt (derecha). Hay un acuerdo excelente de los elementos de estructura secundaria entre las dos proteínas, a pesar

de tener únicamente ~12 % de identidad de secuencia. Una de las diferencias más acentuadas es la ubicación del péptido de fusión (N-terminal de la subunidad F_1), también mostrado en la FIG. 7. La estructura F de PIV5 se describió como que consiste en tres dominios: I, II y III (Yin *et al.*, *Nature*, 439, 38 (2006)). El dominio III llamado el lóbulo distal a la membrana, mientras que los dominios I y II abarcan el barril central y el lóbulo proximal a la membrana. La estructura PIV5 escindida mostrada aquí se generó a partir de PDB ID: 4GIP (Welch *et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 109, 16672 (2012)).

La **FIG. 7** muestra una serie de diagramas que ilustran glicoproteínas virales de prefusión Tipo I. Las estructuras de prefusión de F de RSV, F de PIV5 (PDB ID: 4GIP (Welch *et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 109, 16672 (2012)), HA de la gripe (PDB ID: 2HMG; Wilson *yet al., Nature,* 289, 366 (1981)) y GP de Ébola (PDB ID: 3CSY; Lee *et al., Nature,* 454, 177 (2008)) se muestran como superficies moleculares, con cada uno de los protómeros coloreado de manera diferente. En la fila inferior se muestra una esfera para el residuo C-terminal de F_2 (RSV y PIV5) o HA_1 (Gripe), y se muestra una esfera para el residuo N-terminal del péptido de fusión. El RSV y PIV5 son ambos paramixovirus y sus proteínas F comparten ~12 % de identidad de secuencia. Aunque el GP de Ébola es una proteína de fusión tipo I, éste carece de un péptido de fusión N-terminal libre en GP2 y, en cambio, contiene un bucle de fusión interno que se observa comúnmente en las proteínas de fusión tipo II y tipo III. Por lo tanto, el GP de Ébola se omitió de la comparación del péptido de fusión.

La **FIG. 8** es un conjunto de gráficas que se refieren a la neutralización de RSV por IgG y Fab. D25, AM22 y Motavizumab neutralizan RSV igualmente bien como IgG o Fab. Obsérvese que el eje x para la gráfica de Motavizumab es diferente que las otras.

Las **FIGs. 9A y 9B** son una serie de diagramas y gráficas que ilustran las propiedades de sitios antigénicos en la glicoproteína F de RSV. Únicamente los anticuerpos dirigidos al sitio antigénico Ø se unen específicamente a la conformación de prefusión y tienen potencia de neutralización excepcional. (A) Para el sitio Ø, se muestra una imagen de un solo enlace de Fab de D25 al trímero F de RSV de prefusión, junto con curvas de neutralización para AM22 y D25. Para el sitio I, las flechas apuntan a Pro389, una mutación de escape conocida (Lopez *et al., J. Virol.,* 72, 6922 (1998)). Se muestra una curva de neutralización para el anticuerpo 131-2a. De manera similar al anticuerpo 2F (Magro *et al., J. Virol.,* 84, 7970 (2010)), el anticuerpo 131-2a únicamente neutraliza ~ 50 % del virus. (B) Para los sitios antigénicos II y IV, los modelos de la unión de Motavizumab (sitio II) y 101F (sitio IV) a las estructuras F de prefusión y de post-fusión (McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011)) se hicieron utilizyo las coordenadas de las estructuras de anticuerpo-péptido (McLellan *et al., J. Virol.,* 84, 12236 (2010); McLellan *et al., Nat. Struct. Mol. Biol.,* 17, 248 (2010)).

La **FIG. 10** muestra una imagen de un gel de poliacrilamida que ilustra la expresión de la construcción de proteína F de RSV recombinante con la sustituciones de aminoácido S155C y S290C y un dominio Foldon enlazado al extremo C de F_1, y un conjunto de diagramas que ilustran que el enlace disulfuro entre S155C y S290C puede únicamente formarse en la conformación de prefusión de la proteína F de RSV.

La **FIG. 11** es un conjunto de gráficas que muestran los resultados de ELISA y los ensayos de filtración en gel utilizyo la construcción de proteína F de RSV recombinante con las sustituciones de aminoácido S155C y S290C y un dominio Foldon enlazado al extremo C de F_1. Los datos de ELISA indican que la construcción S155C/S290C se une específicamente por los anticuerpos específicos de prefusión de F de RSV. Los perfiles de filtración en gel muestran que la construcción S155C/S290C existe solamente como un trímero, mientras que los agregados y las rosetas se forman en solución con una construcción F de RSV de control que carece de las sustituciones S155C/S290C.

La **FIG. 12** muestra imágenes de microscopía electrónica de tinción negativa de la construcción de proteína F de RSV recombinante con las sustituciones de aminoácido S155C y S290C y un dominio Foldon enlazado al extremo C de F1. Las imágenes abajo del panel grye son promedios 2D de partículas individuales. Los resultados indican que la construcción S155C/S290C se estabiliza en la conformación de prefusión.

Las **FIGs. 13-14** muestran un conjunto de gráficas que ilustran la respuesta del anticuerpo neutralizante de los ratones a los que se administraron RSV nativo (RSV), RSV inactivado con formalina (FI-RSV), la construcción de proteína F de RSV recombinante con sustituciones de aminoácido S155C y S290C y un dominio Foldon enlazado al extremo C de F_1 (F de prefusión), o una construcción de proteína F de RSV estabilizada en la conformación de post-fusión (RSV de post-fusión). Se muestra la respuesta del anticuerpo a las 5 semanas (FIG. 13) y 7 semanas (FIG. 14) de inmunización post-inicial.

La **FIG. 15** muestra imágenes digitales de los cristales de una proteína F de RSV recombinante soluble estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C y S290C. Izquierda, imágenes claras estándares; Derecha, imágenes ultravioleta, indicativas de proteínas. La formación de cristales a partir de soluciones tamponadas acuosas demuestra que esta proteína es sustancialmente homogénea en solución.

La **FIG. 16** muestra el diseño de un antígeno basado en proteína F de RSV (RSV_A F(+)FdTHS) estabilizado por mutaciones de unión de disulfuro modificadas por ingeniería genética S155C y S290C ("DS"), mutaciones de

relleno de cavidad S190F y V207L ("Cav1") y el dominio de trimerización heterólogo C-terminal anexo (Fd). La estructura F de RSV unida a D25 se muestra con dos de los protómeros exhibidos como una superficie molecular de color rosa y canela, y el tercer protómero exhibido como cintas. Se muestran los residuos N- y C-terminal de F_1 que se mueven más de 5 Å entre la conformación de pre y post-fusión. Los recuadros muestran el enlace disulfuro modificado por ingeniería genética entre los residuos S155C y S290C (denominado "DS"), así como las mutaciones de cavidad de relleno del espacio S190F y V207L (denominadas "Cav1"). Un modelo del dominio de trimerización de fibritina de fago T4 se muestra en la base del trímero de prefusión. La proteína F de RSV que incluye las sustituciones S155C y S290C, y S190F y V207L en el subtipo A de RSV humano, y el dominio Foldon heterólogo C-terminal anexo, se denomina RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. Las mutaciones compatibles con el reconocimiento de D25, pero insuficientemente estables para permitir la purificación como un trímero homogéneo, se marcan y se muestran en representación de palitos negros.

La **FIG. 17** muestra la caracterización antigénica de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. Las velocidades de asociación y disociación de D25 soluble, AM22, 5C4, 101F, Motavizumab y la interacción de Fab de Palivizumab con RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 inmovilizado se midieron utilizyo un instrumento OctetRED 384™ (ForteBio, Menlo Park, CA). Se proporcionan las constantes de disociación en equilibrio para cada uno de los anticuerpos.

La **FIG. 18** muestra la cromatografía de exclusión por tamaño de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. La proteína purificada, después de la segmentación de trombina para eliminar las etiquetas, se hizo pasar sobre una columna de exclusión por tamaño 16/70 Superose 6. El volumen de elución es consistente con un trímero glicosilado.

La **FIG. 19** muestra una tabla que lista las características antigénicas y físicas de las variantes RSV_A F(+)FdTHS estabilizadas por alteraciones DS, Cav1 o DSCav1. La columna más a la izquierda define la variante F de RSV, y el resto de las columnas proporcionan propiedades variantes, incluyendo el rendimiento de plásmidos transitoriamente expresados, la antigenicidad contra diversos sitios antigénicos y la retención de unión de D25 (proporcionada como una cantidad fraccionaria) después de 1 hora de incubación en diversas temperaturas, pHs y osmolalidad, o para 10 ciclos de congelación-descongelación. La variante DSCav1 conserva el reconocimiento del sitio antigénico Ø, con estabilidad física mejorada, como se estimó por la retención más alta de la reactividad de D25 después de exposición a extremos de temperatura, pH, osmolalidad y congelación-descongelación, luego cualquiera de las variantes DS o Cav1.

La **FIG. 20** muestra una representación de cinta de la estructura cristalina de 3.1 Å de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. Las cintas más gruesas corresponden a factores B incrementados. A pesar de las mutaciones estabilizantes, el sitio antigénico Ø, en el ápice del trímero, conserva una flexibilidad significativa.

La **FIG. 21** muestra la comparación de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 a F de RSV unida a D25. La representación de cinta de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1, superpuesta con una representación de cinta de F de RSV unida a D25 de color blanco (PDB ID 4JHW). Las imágenes se relacionan por una rotación de 90° alrededor del eje vertical.

La **FIG. 22** muestra las mutaciones estabilizantes en la estructura RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. La representación de bola y palito de la estructura cristalina RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 con la densidad de electrones $2F_o$-F_c contorneada en 1σ se muestra como una malla. Estas imágenes indican que se observa la densidad de electrones correspondiente al enlace disulfuro entre los residuos de cisteína 155 y 290 (izquierda), así como el residuo Phe190 de relleno de la cavidad (derecha).

La **FIG. 23** muestra la inmunogenicidad de ratón de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. Diez ratones CB6 por grupo se inmunizaron con 10 μg de proteína RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 mezclada con 50 μg de adyuvante poli I:C. Las inmunizaciones ocurrieron en 0 y 3 semanas, y los sueros de la semana 5 y la semana 7 se testaron para la neutralización de RSV subtipo A (RSV_A) y B (RSV_B). Los valores medios se indican por líneas horizontales.

La **FIG. 24** muestra la inmunogenicidad de primate no humano (NHP) de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1. Cuatro macacos Rhesus no tratados con RSV por grupo se inmunizaron con 50 μg de proteína RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 mezclada con 500 μg de adyuvante poli I:C. Las inmunizaciones se ocurrieron a las semanas 0 y 4, y los sueros de la semana 6 se testaron para la neutralización de RSV subtipo A (izquierda) y B (derecha). Los valores medios se indican por líneas horizontales.

Las **FIGs. 25A-25C** muestran mapas de plásmido de vectores de expresión. (**A**) Un mapa del vector de expresión de RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 (SEQ ID NO: 384) para expresar la proteína F de RSV recombinante del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, el sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II. (**B**) Un mapa del vector de expresión RSV_B (B1) F(+)FdTHS DSCav1 paH (SEQ ID NO: 386) para expresar la proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano (cepa B1) que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L, condensado a un dominio Foldon C-terminal, el sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II. (**C**) Un mapa del vector de expresión RSV_B (18537) F(+)FdTHS DSCav1 paH

(SEQ ID NO: 388) para expresar la proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano (cepa 18537) que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L, condensada a un dominio Foldon C-terminal, el sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II.

Las **FIGs. 26A-26D** ilustran el diseño de vacuna basado en la estructura para RSV: un paradigma del supersitio. (A) La infección natural por RSV induce anticuerpos diversos, con una gama de potencias de neutralización viral. (B) Una agrupación de epítopos para anticuerpos altamente potentes, inducidos de forma natural define un supersitio de vulnerabilidad viral. Se muestran los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo potentemente neutralizante D25 que reconoce un epítopo en el ápice del trímero F de RSV. Los epítopos espacialmente solapantes en el ápice de trímero también son reconocidos por los anticuerpos AM22 y 5C4, que comparten las mismas características de neutralización deseadas que D25. Estos epítopos de solapamiento definen el sitio antigénico Ø como un supersitio de vulnerabilidad de RSV. (C) Después de la selección de un supersitio objetivo, un proceso iterativo de diseño, la caracterización de las propiedades antigénicas y físicas, la determinación de la estructura al nivel atómico y la estimación de inmunogenicidad permite la optimización basada en la estructura de antígenos de vacuna que codifican el supersitio objetivo. (D) Debido al supersitio de vulnerabilidad viral que induce de forma natural anticuerpos altamente protectores, la inmunización con "inmunógenos del supersitio" induce más fácilmente la respuesta protectora que los inmunógenos basados en las regiones virales reconocidas por anticuerpos subdominantes o no potentemente neutralizantes.

La **FIG. 27** muestra el diseño Fs de RSV estabilizadas en el sitio trimérico Ø soluble. Se diseñaron más de 100 variantes de F de RSV que contenían el dominio de trimerización de fibritina T4 (foldon) para el sitio antigénico Ø de retención más estable. Se muestra aquí la estructura del trímero F de RSV en su conformación unida a D25 con el foldon modelado. El trímero se exhibe con dos protómeros como superficies moleculares sombreadas en gris claro, canela y rosa, y el tercer promotor como cintas. La cinta se sombrea en blanco en regiones en donde es relativamente fijada entre la pre- y la post-fusión, mientras que los residuos N- y C-terminales que se mueven más de 5 Å entre las conformaciones de pre- y post-fusión se sombrean en gris más oscuro. Las mutaciones compatibles con la expresión y el reconocimiento de D25 inicial, pero insuficientemente estables para permitir la purificación como un trímero homogéneo se marcan y se muestran en representación de palitos negros. Los recuadros muestran acercamientos de las mutaciones estabilizantes en representación de palitos para las variantes DS, Cav1 y TriC, todas las cuales retienen establemente el sitio antigénico Ø (FIG. 31).

Las **FIGs. 28A-28C** muestran estructuras de los trímeros F de RSV, diseñados para preservar el sitio antigénico Ø. (A-C) Se muestran seis estructuras para las variantes F de RSV, marcadas por la mutación estabilizante (DS, Cav1, DS-Cav1 y DS-Cav1-TriC) y por la red (cúbica y tetragonal) y el pH de cristalización. (A) Los trímeros F de RSV se exhiben en una representación de gusano Cα, coloreada de acuerdo con el factor de movilidad atómico. Las regiones pérdidas se muestran como líneas discontinuas. Estas se producen en la región próxima de la membrana C-terminal, donde el motivo foldon no se observa, excepto en la estructura DS-Cav1-TriC (más a la derecha). En la estructura DS, dos bucles en la región de cabeza también están desordenados. (B) El sitio antigénico Ø de un protómero F de RSV se exhibe en el diagrama de cinta, con la estructura de F de RSV unida a D25 en gris y diferentes variantes indicadas. Las mutaciones estabilizantes se marcan y se muestran en representación de palitos. (C) Los detalles del nivel atómico se muestran en representación de palitos, con las regiones de F de RSV que cambian la conformación entre la conformación de prefusión y post-fusión en gris oscuro, y aquellas que permanecen constantes en gris más claro. Se indican los átomos de carbono estabilizantes para estabilizar las mutaciones. En Cav1 (pH 5.5) y en DS-Cav1 (pH 5.5) se observaron características novedosas que implican la interacción del extremo C del péptido F_2 con un ion sulfato y el péptido de fusión. En la estructura DS-Cav1-TriC, las mutaciones D486H-E487Q-F488W-D489H interactúan con los dos protómeros vecinos alrededor del eje del trímero.

Las **FIGs. 29A-29B** muestran resultados relacionados con la inmunogenicidad de trímeros F de RSV modificados por ingeniería genética. Las proteínas F de RSV modificadas por ingeniería genética para exhibir establemente el sitio antigénico Ø inducen títulos neutralizantes significativamente más altos que los inducidos por la F de post-fusión. (A) Los títulos de neutralización de sueros de ratones inmunizados con 10 μg de F de RSV (izquierda). La F de post-fusión, así como la F de RSV unida por los anticuerpos AM22 o D25, se inmunizaron a razón de 20 μg por ratón (derecha). La media geométrica se indica por una línea horizontal. (B) Los títulos de neutralización de sueros de macaco Rhesus inmunizados con 50 μg de variantes de proteína F de RSV. La media geométrica se indica por una línea horizontal. El umbral protector está indicado por una línea discontinua, y el valor *p* proporcionado para la post-fusión contra DS-Cav1.

Las **FIGs. 30A-30D** muestran como las propiedades físicas, estructurales y antigénicas de la F de RSV estabilizada con el sitio antigénico Ø se correlacionan con la inmunogenicidad. (A) Estabilidad física del sitio Ø frente a la inmunogenicidad. El diagrama muestra la estabilidad física de transFer de información según se determina por 7 mediciones de la retención de D25 de la actividad en FIG. 31 que se promediaron (eje horizontal) y se compararon con los títulos protectores de RSV inducidos de la FIG. 29 (eje vertical). (B) La imitación estructural del sitio Ø frente a la inmunogenicidad. El diagrama muestra la transferencia de información.

La imitación estructural (eje horizontal) es la rmsd (siglas inglesas de desviación cuadrática media) entre las diferentes estructuras (FIG. 28) y F de RSV unida a D25 para todos los átomos dentro de 10 Å de D25. Esto es para comparar los títulos protectores de RSV inducidos de la FIG. 29 (eje vertical). (C) Análisis antigénicos de sueros de macacos inmunizados. La unión de sueros a DS-Cav1 inmovilizados (izquierda) o F de post-fusión (derecha) se midió directamente (Blanco, barras negras) o después de la incubación con la F de post-fusión en exceso (barras grises oscuras) o DS-Cav1 (barras grises claras). Se representa la respuesta media de los cuatro sueros del macaco, con las barras de error para la desviación estándar. (D) Correlación de la inmunogenicidad y antigenicidad de los sueros NHP. Los títulos de neutralización medios de los cuatro sueros de los macacos en cada uno de los grupos se representan frente a la relación de respuestas de unión a DS-Cav1 y F de post-fusión.

Las **FIGs. 31A-31B** son una tabla que muestra los resultados de la caracterización antigénica y física de los inmunógenos de proteína F de RSV. #Definido para el estado trimérico, pero si no se pudo purificar el estado trimérico, entonces el estado oligomérico de la especie oligomérica dominante. Si el rendimiento total es < 0.1 mg/l, entonces el estado oligomérico no se determina (N.D.). *El rendimiento se muestra para el estado oligomérico específico. > 1000 nM = ninguna unión a la concentración de 1 μM. N/A = no aplicable.

La **FIG. 32** muestra la ubicación de S155 y S290 en las estructuras F de RSV de pre- y post-fusión. Los carbonos β de los residuos de serina 155 y 290 están 4.4 Å separados en la estructura F de RSV unida a D25 y 124.2 Å separados en la estructura de post-fusión. Las mutaciones S155C y S290C (denominado "DS") restringieron la estructura en la conformación de prefusión.

Las **FIGs. 33A-33C** muestran la tinción negativa de la proteína F estabilizada. A) y B) muestran campos representativos de muestras negativamente teñidas para DS y DS-Cav1. Las proteínas son altamente homogéneas con < 1% y < 0.1 % de conformaciones post-F observadas en DS y DSCav1, respectivamente. Ejemplos de conformaciones post-F se indican por flechas negras. Barra = 50 nm. Los promedios de partícula 2D se muestran como recuadros en la esquina derecha superior en dos veces el aumento. Barra = 5 nm. C) Muestra una comparación de los promedios 2D con el promedio del complejo F+D25 (McLellan et al. 2013). Barra = 5 nm.

La **FIG. 34** muestra que el ELISA basado en el anticuerpo D25 de los sobrenadantes de cultivo bruto se correlaciona (Spearman R = 0.7752 y un valor P = 0.0041) con el rendimiento de variantes de glicoproteína F de RSV oligomérica purificada. La producción de glicoproteína F de RSV por células 293 Expi se determinó mediante ELISA de D25 de los sobrenadantes de cultivo bruto a 4 °C una semana después de la recolección y se encontraron que se correlacionaban con el rendimiento de las variantes de glicoproteína F de RSV oligoméricas puras (Tabla 1).

La **FIG. 35** muestra el ELISA basado en el anticuerpo motavizumab de los sobrenadantes de cultivo bruto frente al rendimiento de variantes de glicoproteína F de RSV purificadas. (A) La producción de glicoproteína F de RSV por células 293 Expi se determinó mediante ELISA de motavizumab de los sobrenadantes de cultivo bruto a 4 °C inmediatamente tras la recolección y (B) una semana después de la recolección. Los datos del ELISA se representan frente al rendimiento de las variantes de glicoproteína F de RSV después de la afinidad estreptactina. Curiosamente, tres proteínas, RSV F(+) Fd y dos variantes F137W-F140W y T357C-N371C se detectaron como altamente expresadas por ELISA de motavizumab, pero se obtuvieron bajos rendimientos después de la purificación a gran escala (puntos mostrados a lo largo de la ordenada).

La **FIG. 36** muestra la caracterización de las glicoproteínas F de RSV diseñadas utilizyo la cromatografía de exclusión por tamaño. Las variantes F de RSV, a: Cav1; b: Cav1-TriC; c: DS-Cav1-TriC; d: F488W; e: DS-Cav1; f: TriC, g: DS-TriC; h: DS; exhiben perfiles de elución característicos de una proteína trimérica globular, mientras que las variantes F de RSV i: S190F-V296F; j: K87F-V90L; k: V207L-V220L; l: V178N; m: S403C-T420C; n: I506K; o: V185E; p: F137W-F140W-F488W; q: D486H-E487Q-D489H exhiben perfiles de elución característicos de especies oligoméricas más altas. Los estándares de proteína de peso molecular conocido se marcan en la base del cromatograma.

La **FIG. 37** muestra el sitio antigénico Ø mostrado desde arriba. Las regiones de DS que no son visibles se representan por líneas discontinuas.

Las **FIGs. 38A-38B** muestran resultados relacionados con la caracterización antigénica de los complejos de inmunógeno-adyuvante para la inmunización de primates no humanos. (A) post-fusión F de RSV, DS y la reactividad de muestra DS-Cav1 se estimó contra el fragmento de unión a antígeno D25 de 1 μM menos de 3 h después de la formulación del inmunógeno con Poli I:C e inmunizaciones de NHP el día 0 y (B) la semana 4.

Las **FIGs. 39A-39B** muestra el análisis antigénico de sueros de ratones inmunizados y macacos Rhesus. A) Los sueros de los ratones inmunizados con múltiples variantes F de RSV estabilizadas se estimaron para el enlace a DS-Cav1 inmovilizado que se midió directamente o DS-Cav1 después de la incubación con D25 en exceso o fragmentos de unión a antígeno de motavizumab para estimar las respuestas del sitio Ø o el sitio II. B) Los sueros de los macacos Rhesus se estimaron para la unión a las variantes F de RSV DS-Cav1 o de post-fusión

inmovilizadas que también se bloquearon con fragmentos de unión a antígeno de D25 o de motavizumab. La respuesta media de los sueros de los animales se muestra, con barras de error para la desviación estándar.

La **FIG. 40** muestra la colección de datos cristalográficos y las estadísticas de refinamiento.

La **FIG. 41** muestra el efecto de utilizar construcciones de RSV subtipo B con las sustituciones DS y que adyuvantes que incluyen agonistas de TLR4 pueden trabajar con la proteína F estabilizada. Los ratones CB6F1/J se inmunizaron con 10 µg de la versión DS S155C/S290C de la F de prefusión estabilizada formulada con 50 µl de Ribi (sistema adyuvante Ribi, Sigma). Los ratones se inocularon a las 0 y 3 semanas ya sea con la construcción del subtipo A (SEQ ID NO: 185), la construcción del subtipo B (SEQ ID NO: 1479) o ambos (10 µg de cada una). En el momento de 5 semanas (2 semanas después de la segunda inyección), se obtuvo el suero para ensayos de neutralización. Los dos descubrimientos principales de este experimento fueron que 1) $preF_A$-DS y $preF_B$-DS indujeron niveles iguales de actividad neutralizante contra RSV subtipo A, mientras que $preF_B$-DS indujo un nivel más alto de actividad neutralizante que $preF_B$-DS contra RSV subtipo B. Esto sugiere que la utilización de las construcciones RSV subtipo B puede tener un mejor potencial neutralizante cruzado que los construcciones de subtipo A o que se pueden preferir versiones híbridas de F de RSV que incluyen elementos de ambos subtipos. 2) El adyuvante Ribi es una emulsión de aceite en agua que contiene el monofosforil lípido A, que es un agonista de TLR4 y representativo de algunos de los adyuvantes comerciales. Estos datos demuestran que, además de polil:C (un agonista de TLR3), los adyuvantes que incluyen los agonistas de TLR4 funcionan con la proteína F de prefusión estabilizada como un antígeno de vacuna.

La **FIG. 42** muestra que la F de prefusión estabilizada se puede formular en aluminio así como polil:C y puede conservar la inmunogenicidad conferida por las respuestas de anticuerpo al sitio antigénico Ø. Ratones BALB/c se inmunizaron con 20 µg de la versión DS S155C/S290C de F de prefusión estabilizada derivada del subtipo A y se formuló con aluminio (gel de hidróxido de aluminio 10 mg/ml, Brenntag, Frederikssund, Dinamarca) o polil:C. Los ratones se inocularon a las 0 y 3 semanas, y en el momento de 5 semanas (2 semanas después de la segunda inyección), se obtuvo el suero para ensayos de neutralización.

La **FIG. 43** es un diagrama esquemático que ilustra un esquema de diseño ejemplar para antígenos F de RSV de cadena sencilla (scF) estabilizados en prefusión, que incluyen las variables que están implicadas con varios diseños de scF de RSV diferentes. Los elementos de diseño que pertenecen a scF de RSV nº 9 (BZGJ9 DS-Cav1; SEQ ID NO: 669) se perfilan en gris oscuro.

Las **FIGs. 44A y 44B** ilustran el diseño de la construcción F de RSV de cadena sencilla nº 9 (scF nº 9; BZGJ9 DSCav1; SEQ ID NO: 669). La numeración indica las ubicaciones de residuo de los diversos componentes descritos más adelante. (A) Representaciones esquemáticas de la glicoproteína F(+) de RSV escindida con furina como se muestra en la FIG. 44B (parte superior) y el diseño de scF de RSV nº 9 (parte inferior), que muestra el dominio de trimerización foldon (óvalo gris), y el enlazador artificial (cuadrado gris), que puentea las cadenas principales de polipéptido de F_2 (izquierda) y F_1 (derecha). (B) Base estructural para el diseño de scF de RSV nº 9 utilizyo una estructura F(+) de RSV estabilizada en prefusión como un modelo (PBD ID: 4MMV). F(+) de RSV se muestra en representación de dibujo y el dominio de trimerización foldon se muestra en representación de esfera. Mostrado a la izquierda está el trímero F(+) de RSV estabilizado en prefusión, con los tres protómeros coloreados en negro, gris y blanco. Mostrado a la derecha está un protómero F(+) de RSV individual que muestra F_1 (gris mediano), F_2 (gris oscuro), el péptido de fusión (indicado) y el dominio de trimerización foldon (gris claro, indicado). El recuadro muestra el péptido de fusión en representación de palitos, y la ubicación de la secuencia enlazadora flexible (línea discontinua) que une los residuos 104 y 147.

La **FIG. 45** muestra una tabla relacionada con el diseño, estado oligomérico y rendimiento de producción de construcciones F de RSV de cadena sencilla diseñados expresados en células HEK293-F. Se indican la construcción F de RSV nº 9 DSCav1 (scF nº 9; BZGJ9 DSCav1; SEQ ID NO: 669), construcción F de RSV nº 10 DSCav1 (scF nº 10; BZGJ10 DSCav1; SEQ ID NO: 670), construcción F de RSV nº 11 DSCav1 (scF nº 11; BZGJ11 DSCav1; SEQ ID NO: 671). Las secuencias de enlazador proporcionadas incluyen GSGNIGLGG (SEQ ID NO: 364), GSGGNGIGLGG (SEQ ID NO: 359), GSGNVLGG (SEQ ID NO: 361) y GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 362). (%) Las mutaciones estabilizantes de prefusión incluyen las siguientes: S155C y S290C (DS); S190F y V207L (Cav1); mutaciones no adicionales (a). Todas las variantes contienen la mutación puntual L373R. (==) Los dominios de trimerización incluyen lo siguiente: L512C y L513C (CC); D486C, E487P y F489C (CPC). (#) Frecuentemente se observó que las variantes existen en una mezcla de estados de oligómero en la cromatografía por tamaño. Si se observó una fracción trimérica mensurable, entonces el estado oligomérico se enumera como "Trímero". Si no se observó fracción trimérica, entonces se proporciona el estado oligomérico de la especie dominante. Si el rendimiento total antes de la cromatografía por tamaño fue < 0.1 mg/L, entonces el estado oligomérico se enumera como no determinado (N.D.). Si el estado oligomérico era indistinguible mediante la cromatografía de exclusión por tamaño, el estado oligomérico se enumera como "Agregado". (*) El rendimiento mostrado se calculó de la post-purificación de *Strep*Tag y se enumera para el estado oligomérico específico. (Φ) El rendimiento de HEK 293F se estima en base a la relación observada entre el rendimiento de expresión Expi293F y el rendimiento de expresión Freestyle293F observado en las construcciones scF (~2:1).

Las **FIGs. 46A y 46B** son un conjunto de gráficas que ilustran la caracterización de las glicoproteínas F de RSV de cadena sencilla, modificadas por ingeniería genética mediante la cromatografía por exclusión de tamaño. (**A**) Perfiles de exclusión por tamaño de las variantes scF de RSV (scF nº 3, 4, 6, 8 a 11) y mutaciones estabilizantes DS-Cav1 que contienen RSV $F_{(+)}$. Las construcciones de cadena sencilla se expresaron en células HEK293F y F(+) DS-Cav1 se expresó en células Expi 293-F. F(+) DS-Cav1 y scF nº 3 DS-Cav1, nº 4 DS-Cav1, nº 6 DS-Cav1 y nº 9 DS-Cav1 exhiben características de perfiles de elución de una proteína trimérica globular, mientras que scF nº 11 DSCav1 exhibe un perfil de elución característico de una proteína monomérica globular. RSV scF nº 8 DS-Cav1 y scF nº 10 DS-Cav1 exhiben perfiles de elución que sugieren una mezcla heterogénea de especies tanto monoméricas como triméricas. (**B**) Perfiles de exclusión por tamaño de RSV F(+) DS-Cav1 y RSV scF nº 9 que contienen diferentes mutaciones estabilizantes. F(+) DS-Cav1 y scF nº 9 Cav1 se expresaron en células Expi 293-F y las variantes scF nº 9 restantes se expresaron en células HEK293F. La desviación ligera en los perfiles de elución de las variantes scF nº 9 sugieren que scF nº 9 discurre en un peso molecular más alto que F(+) trimérico. Un asterisco indica que las etiquetas de purificación se segmentaron antes de la filtración en gel.

La **FIG. 47** es una tabla que resume los resultados de la caracterización antigénica de scF de RSV nº 9 DS-Cav1.

La **FIG. 48** es una tabla que muestra los datos cristalográficos y la estadística de refinamiento para la estructura tridimensional de scF de RSV nº 9 DS-Cav1.

Las **FIGs. 49A y 49B** muestran una serie de diagramas relacionados con la estructura cristalina del trímero scF de RSV nº 9 DS-Cav1. La orientación del protómero exhibió una representación de dibujo (gris oscuro) que se mantiene constante. Las líneas discontinuas gruesas representan el motivo foldon C-terminal ubicado en la región próxima de la membrana, que no está visible en la estructura de cristal. (**A**) El trímero scF de RSV nº 9 DS-Cav1 se exhibe con protómeros en representación de dibujo y representación de cinta (gris oscuro) y la representación de superficie molecular (gris claro). El recuadro muestra el agryamiento del bucle enlazador scF "GS" nº 9 (indicado) y el protómero adyacente (gris oscuro), ambos en representación de palitos. (**B**) Las mutaciones estabilizantes de prefusión en la estructura scF de RSV nº 9 DS-Cav1. Las mutaciones estabilizantes de prefusión de DS y Cav1 se indican y se muestran en representación de palitos.

La **FIG. 50** es un diagrama que ilustra el alineamiento estructural de scF de RSV nº 9 DS-Cav1 (gris medio) con la estructura F(+) DS-Cav1 (gris claro; rmsd = 0.839 Å) y con la estructura F(+) unida a D25 (gris oscuro; rmsd = 0.534 Å), todos exhibidos en representación de dibujo. El recuadro muestra un acercamiento del bucle enlazador de scF nº 9 y los péptidos de fusión de la estructura F(+) DS-Cav1 y la estructura F(+) unida a D25.

La **FIG. 51** muestra diagramas que ilustran la comparación de los diseños de scF de RSV nº 3, 4, 6, 8-11 utilizyo la estructura cristalina de scF de RSV nº 9 DS-Cav1. Las líneas discontinuas gruesas representan el motivo foldon C-terminal. El protómero scF de RSV nº 9 DS-Cav1 exhibido en representación de dibujos (gris oscuro). El recuadro muestra el agradamiento del bucle enlazador scF "GS" nº 9 en representación de palitos que unen los residuos 105 (F_2) y 145 (F_1). Las ubicaciones predichas de las secuencias de enlazador flexibles para los diseños de scF nº 3, 4, 6 y 8 (línea discontinuas finas) que unen los residuos 97 (F_2) y 150 (F_1) se mapean en la estructura cristalina scF nº 9 DS-Cav1. Las ubicaciones predichas de las secuencias de enlazador para los diseños de scF nº 3, 4, 6 y 8 (líneas discontinuas finas) se mapean en la estructura del trímero scF nº 9 DS-Cav1. Se aproximan las ubicaciones del residuo puntual de extremo de enlazador.

La **FIG. 52** muestra un conjunto de imágenes digitales relacionadas con la caracterización de las glicoproteínas F de RSV de cadena sencilla diseñadas, caracterizadas por la purificación post *Strep*Tag de electroforesis en gel SDS-PAGE. Las construcciones scF de RSV se expresaron en células HEK293F y se purificaron mediante la cromatografía de afinidad de His_6-tag y *Strep*Tag.

La **FIG. 53** es un conjunto de gráficas y una tabla que proporciona los datos de neutralización de la semana 5 para las construcciones indicadas (10 animales/grupo). Inmunizaciones en la Semana 0 y la Semana 3 con 10 μg de proteína + 50 μg de Poli I:C por animal.

La **FIG. 54** es un diagrama de cinta y palitos que resalta el residuo de Prolina en la posición F 101 de RSV en la estructura tridimensional de scF de RSV nº 9 (SEQ ID NO: 669). La estructura indica que la región de enlazador de cadena sencilla se puede mejorar al eliminar la Prolina 101 o al acortar/mutar los residuos de enlazador y los residuos adyacentes.

La **FIG. 55** es una gráfica y un alineamiento de secuencia que ilustra la modificación de la construcción scF nº 9 (SEQ ID NO: 669) para generar las construcciones BZG J9-1 a BZG J9-10. El alineamiento de secuencia muestra las secuencias BZG J9-1 a BZG J9-10 correspondientes a los residuos F de RSV 97-159 de SEQ ID NOs: 698-707, respectivamente. Estas construcciones se expresaron en células Expi y se estimaron mediante la filtración en gel (izquierda).

La **FIG. 56** es una serie de gráficas y diagramas esquemáticos que ilustran una nanopartícula de ferritina que incluye la proteína scF nº 9, que se generó al enlazar el extremo C del polipéptido F1 en scF nº 9 a una subunidad de ferritina. Esta construcción se denomina "BZGJ9-DS-Cav1-EnlaceLargo-Ferritina" y se proporciona como SEQ ID NO: 1429.

La **FIG. 57** es un conjunto de gráficas que ilustran la estabilidad física de BZGJ9-DS-Cav1-EnlaceLargo-Ferritina en comparación con scF de RSV DS-Cav1.

Las **FIGs. 58A-58C** son un conjunto de gráficas y una tabla que ilustra la inmunogenicidad de diferentes proteínas F de RSV estabilizadas en prefusión. Las tres construcciones testadas fueron F de RSV DSCav1 (SEQ ID NO: 371), BZGJ9-DS-Cav1-EnlaceLargo-Ferritina (SEQ ID NO: 1429) y scF nº 9 (también denominada BZGJ9 DS-Cav1, SEQ ID NO: 669). A animales Macaca mulata de origen indio que pesaban 8.26-11,34 kg se les inyectaron por vía intramuscular inmunógenos en la semana 0 con 50 μg de proteína + 500 μg de Ribi por animal, Refuerzo en la Semana 4 con 50 μg de proteína + 500 μg de Ribi por animal; la inmunogenicidad se estimó en la semana 3.5.

Las **FIGs. 59A y 59B** son un conjunto de diagramas que ilustran la estructura tridimensional de la proteína F de RSV de la cepa B18537 con las mutaciones DSCav1 (SEQ ID NO: 372). (A) Representación de dibujo de un protómero de F de RSV. (B) Forma trimérica de la glicoproteína de fusión con los protómeros adicionales mostrados en representaciones de superficie y de cinta.

Las **FIGs. 60A-60D** son un conjunto de imágenes que ilustran los detalles a nivel atómico de la glicoproteína F de RSV B18537 con sustituciones DSCav1, y muestran que las sustituciones DSCav1 se pueden introducir en una glicoproteína F de RSV subtipo B para estabilizar el sitio antigénico Ø. (A) Las mutaciones de DS-Cav1 están resaltadas. (B) El sitio antigénico Ø ubicado en el ápice del trímero se muestra en representación de palitos en gris oscuro. (C) La interacción entre el péptido de fusión y las cadenas β 15, 16 y 19 para formar una lámina alargada inter-protomérica. (D) La interacción entre el extremo C de F2 y el péptido de fusión.

Las **FIGs. 61A y 61B** son un conjunto de gráficas e imágenes digitales que ilustran la caracterización antigénica de la glicoproteína de fusión RSV B18537 con sustituciones DSCav1. (A) Las mediciones de interferometría de biocapa de anticuerpos específicos del sitio prototípico se llevaron a cabo mediante la dilución en serie de cada una de las moléculas Fab y se midieron las velocidades de asociación y disociación a las proteínas F B18537 DSCav1 inmovilizadas. (B) Comparación estructural de sitio antigénico Ø de la cepa B18537 y A2. Residuos expuestos en la superficie que difieren entre las dos cepas están marcados.

Las **FIGs. 62A y 62B** son gráficas que ilustran la purificación de la proteína F de la cepa B18537 de RSV con DSCav1. A. SDS-PAGE de la fracción de elución (reducida y no reducida) y la fracción de flujo pasante después de la purificación de afinidad de StrepTag II. B. Filtración en gel de la glicoproteína F B18537 de RSV en tampón GFB en una columna de exclusión por tamaño Superdex-200 de 120 ml.

Las **FIGs. 63-68** ilustran el diseño y la producción de proteínas F de RSV recombinantes triméricas estabilizadas en una conformación de prefusión sin un dominio de trimerización C-terminal para mantener la estabilidad del lóbulo proximal a la membrana de F de RSV. En lugar del dominio de trimerización C-terminal, se introduce un anillo de enlaces disulfuro en el extremo C del polipéptido F1 al sustituir los residuos cisteína con los aminoácidos de la hélice α10.

Las **FIGs. 69A-69E** son un conjunto de tablas que muestran los datos de ELISA para las variantes F de RSV recombinantes indicadas. La expresión y estabilidad antigénica de las variantes F de RSV (SEQ ID NOs: 859-1018). El ADN que codifica estas variantes F de RSV se transfectó en la célula en el formato de 96 pocillos bajo condiciones en las que las proteínas F de RSV recombinantes se secretan de las células en el medio celular. Cada una de las construcciones contiene una secuencia conductora que provoca que la proteína penetre en el sistema secretorio y sea secretada. El medio se centrifugó después y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de antigenicidad para la unión al anticuerpo D25 específico del sitio Ø y el anticuerpo Motavizumab específico del sitio II ("Mota", FIGs. 69A-69E). Las condiciones testadas incluyen la unión D25 y Mota el día 0 (condiciones 1 y 2), el enlace de D25 y Mota el día 0 después de la incubación a 70 °C durante una hora (condiciones 3 y 4) y el enlace D25 y Mota después de 1 semana a 4 °C (condiciones 5 y 6). El control es la construcción DSCav1 con un dominio foldon. Los datos de antigenicidad específica para cada una de las construcciones se proporcionan en las FIGs. 69A-69E, con las condiciones testadas que se observan en las filas superiores.

Las **FIGs. 70A-70E** son un conjunto de diagramas esquemáticos que ilustran diferentes estrategias de diseño para generar Inmunógenos del Sitio Antigénico Ø de F de RSV. El sitio antigénico Ø incluye el sitio de reconocimiento D25 en la superficie exterior de la hélice α4 de F de RSV de prefusión y el bucle precisamente N-terminal a la hélice α1 de cada uno de los protómeros. Se utilizaron cinco métodos para presentar epítopos del Sitio Ø aislados en la superficie de un inmunógeno: A) permutación circular (es decir, la alteración de los

enlazadores de estructura secundaria para alterar la conectividad de los segmentos del sitio Ø por razones de facilidad y estabilidad de diseño), B) incorporación del sitio Ø en una proteína de armazón pequeño, C) trimerización de permutaciones circulares o el sitio Ø de armazón para igualar la trimerización del sitio Ø nativo observado en el contexto F de RSV de prefusión (como en el panel izquierdo), D) que incluye todo el dominio III para la estabilidad añadida del pliegue del sitio Ø y E) la incorporación de A-D en una plataforma de nanopartícula para la inmunogenicidad añadida.

La **FIG. 71** es un resumen de los inmunógenos del sitio Ø mínimos que se diseñaron, se produjeron y se testaron para la antigenicidad a los anticuerpos D25, AN22 y 5C4 específicos del sitio Ø mediante ELISA bajo las condiciones indicadas. La tabla muestra el número de inmunógenos del sitio Ø que caen dentro de cada una de las categorías de diseño, y que produjeron un resultado de ELISA de por lo menos 1.5.

Las **FIGs. 72A-72F** son un conjunto de tablas que muestran los datos de ELISA para los construcciones del sitio Ø mínimo indicados que se unen al anticuerpo D25, AN22 o 5C4. Las condiciones testadas incluyen la unión de D25 después de 0 y 1 semana a 4 °C (condición 1) y 2), unión de D25 después de 1 h a 60 °C (condición 3), 70 °C (condición 4), 80 °C (condición 5), 90 °C (condición 6) o 100 °C (condición 7), unión de AM22 después de dos semanas a 4 °C (condición 8), unión de 5C4 en la semana 0 (condición 9). También se muestra el promedio de la unión de D25, AM22 y D25 después de 1 hora a 70 °C (condición 10). Puntuaciones ELISA de ≥ 1.5 se resaltan en gris oscuro; las puntuaciones de 0.5-1.5 se resaltan en gris claro.

La **FIG. 73** es un conjunto de gráficas que ilustran que la inmunización con la versión DS de F de prefusión estabilizada subtipo A o B o ambos induce la actividad neutralizante contra ambos subtipos.

La **FIG. 74** es un conjunto de gráficas que ilustran que la respuesta del anticuerpo DSCav1 es durable en ratones después de dos dosis con inmunización en las semanas 0 y 4.

La **FIG. 75** es un conjunto de gráficas que ilustran que la inmunización DS puede prevenir la infección de RSV en ratones.

La **FIG. 76** es un conjunto de gráficas que ilustran que la inmunización DS no induce las respuestas de citoquina Tipo 2 en el post-enfrentamiento en ratones.

La **FIG. 77** es un conjunto de gráficas que ilustran que la respuesta inmune neutralizante de DSCav1 se refuerza y se mantiene después de una 3ª dosis en primates no humanos, que han sido inmunizados previamente con DS-Cav1 o DS en las semanas 0 y 4.

La **FIG. 78** es una gráfica que ilustra que DS-CAV1 se puede formular de manera efectiva en aluminio y puede conservar la inmunogenicidad.

La **FIG. 79** es un conjunto de gráficas que ilustran que el aluminio es un adyuvante efectivo para DSCav1 en primates no humanos.

La **FIG. 80** es una gráfica que ilustra que DS-CAV1 es inmunogénico cuyo se expresa desde un vector a base de gen ya sea solo o como cebado para un refuerzo de proteína.

La **FIG. 81** es un conjunto de gráficas y una tabla que ilustra que F de RSV de DS-Cav1 Subtipo A o B puede reforzar una inmunización inicial utilizyo el suministro a base de gen de la proteína F de tipo salvaje en primates no humanos.

La **FIG. 82** es un conjunto de gráficas que ilustran que F de RSV de DS-Cav1 Subtipo A o B puede reforzar el primate no humano inicializado con rAd-F(A)WT.

La **FIG. 83** es un conjunto de gráficas que ilustran que la inmunización con la versión DS de la F de prefusión estabilizada subtipo A o B o ambos induce la actividad neutralizante contra ambos subtipos de RSV.

La **FIG. 84** es una gráfica que ilustra que la glicosilación alterante reduce la inmunogenicidad de la F de prefusión estabilizada.

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias acompañante se muestran utilizyo las abreviaturas de letras estándares para bases de nucleótidos y el código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Únicamente se muestra una cadena de cada una de las secuencias de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria incluye cualquier referencia a la cadena exhibida. El Listado de Secuencias se presenta como un archivo de texto ASCII en la forma del archivo llamado "Sequence.txt" (~3.2 MB), que se creó el 12 de marzo de 2014. En el Listado de Secuencias

acompañante:

SEQ ID NOs: 1-128 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV nativas del RSV tipo A.

SEQ ID NOs: 129-177 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV nativas del RSV tipo B.

SEQ ID NOs: 178-184 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV nativas del RSV bovino.

SEQ ID NOs: 185-350 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV recombinantes.

SEQ ID NO: 351 es la secuencia de aminoácidos de un dominio Foldon de fibritina T4.

SEQ ID NO: 352 y 355-365 son secuencias de aminoácidos de enlazadores de péptido.

SEQ ID NO: 353 es la secuencia de aminoácidos de una proteína ferritina de *Helicobacter pylori* (GENBANK® Nº Acceso EJB64322.1, como se presenta en la base de datos el 28 de febrero de 2013).

SEQ ID NO: 354 es la secuencia de aminoácidos de una proteína encapsulina (GENBANK® Nº Acceso YP_001738186.1, como se presenta en la base de datos el 28 de febrero de 2013).

SEQ ID NOs: 366 y **367** son las secuencias de aminoácidos V_H y V_L del mAb AM22, respectivamente.

SEQ ID NO: 368 y 369 son las secuencias de aminoácidos V_H y V_L del mAb D25, respectivamente.

SEQ ID NO: 370 es una secuencia de aminoácidos de la variante de proteína F_0 de RSV recombinante de la cepa A2 prototípica (GENBANK Nº acceso P03420, como se presenta en la base de datos el 28 de febrero de 2012), que incluye las sustituciones P102A, I379V y M447V comparado con la secuencia P03420.

SEQ ID NO: 371 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensada a un dominio Foldon C-terminal, el sitio de escisión de trombina, la etiqueta 6xHis y un StrepTag II. Los cuatro residuos mutados, y el anexo C-terminal están subrayados.

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKL
IKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAV**C**K
VLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT**F**KVLDLKNYIDKQLLPI**L**NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEI**C**T
REFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS**C**YSIM**C**IIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTP
CWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPK
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLY
VKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGG
LVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK (RSV A F(+)FdTHS DSCavl)

SEQ ID NO: 372 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II. Los cuatro residuos mutados, y el anexo C-terminal están subrayados.

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKL
IKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNYTINTTKNLNVSISKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAV**C**K
VLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLT**F**KVLDLKNYINNQLLPI**L**NQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEI**C**N
REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQS**C**YSIM**C**IIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTP
CWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSK
YDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKNLY
VKGEPIINYYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGG
LVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK (RSV_B F(+)FdTHS DSCavl)

SEQ ID NO: 373 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del RSV bovino que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II. Los cuatro residuos mutados y el anexo C-terminal están subrayados.

MAATAMRMIISIIFISTYMTHITLCQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVVTIELSKIQKNVCKSTDSKVKL
IKQELERYNNAVIELQSLMQNEPASFSRAKRGIPELINYTRNSTKRFYGLMGKKRKRRFLGFLLGIGSAIASGVAVCK
VLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKELLPKLNNHDCRISNIETVIEFQQKNNRLLEIA
REFSVNAGITTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMCVVKEEVIAYVVQLPIYGVIDTP
CWKLHTSPLCTTDNKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPTDVNLCNTDIFNTK
YDCKIMTSKTDISSSVITSIGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKALY
IKGEPIINYYDPLVFPSDEFDASIAQVNAKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGG
LVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK (bRSV F(+)FdTHS DSCav1)

SEQ ID NO: 374 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290, y S190F, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II. Los tres residuos mutados y el anexo C-terminal están subrayados.

SEQ ID NO: 375 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C y S190F, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (RSV_B F(+)FdTHS DSS190F).

SEQ ID NO: 376 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del RSV bovino que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C y S190F, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (bRSV F(+)FdTHS DSS190F).

SEQ ID NO: 377 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del RSV A que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F, V207L, condensadas a un dominio de ferritina C-terminal _(RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 Ferritina).

SEQ ID NO: 378 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del RSV B que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F, V207L, condensadas a un dominio de ferritina C-terminal. (RSV_B F(+)FdTHS DSCav1 ferritina).

SEQ ID NO: 379 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del bRSV que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F, V207L, condensadas a un dominio de ferritina C-terminal (bRSV F(+)FdTHS DSCav1 ferritina).

SEQ ID NO: 380 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del RSV A que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F, condensadas a un dominio de ferritina C-terminal. (RSV_A F(+)FdTHS DSS190F Ferritina).

SEQ ID NO: 381 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del RSV B que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F, condensadas a un dominio de ferritina C-terminal. (RSV_B F(+)FdTHS DSS190F ferritina).

SEQ ID NO: 382 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV recombinante del bRSV que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F, condensadas a un dominio de ferritina C-terminal (bRSV F(+)FdTHS DSS190F ferritina).

SEQ ID NO: 383 es una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica una proteína F de RSV recombinante del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (ADN que codifica RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 expresado del VRC3798).

SEQ ID NO: 384 es una secuencia de nucleótidos de un vector de expresión para expresar la proteína F de RSV recombinante del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (vector RSV_A F(+)FdTHS DSCav1 paH; VRC3798).

SEQ ID NO: 385 es una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica una proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano (cepa B1) que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (ADN que codifica RSV_B (B1) F(+)FdTHS DSCav1; expresado de VRC3764).

SEQ ID NO: 386 es una secuencia de nucleótidos de un vector de expresión para expresar la proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano (cepa B1) que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (vector RSV_B (B1) F(+)FdTHS DSCav1 paH; VRC3764).

SEQ ID NO: 387 es una secuencia de nucleótidos ejemplar que codifica una proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano (cepa 18537) que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (ADN que codifica RSV_B F(+)FdTHS DSCav1; expresado de VRC3799).

SEQ ID NO: 388 es una secuencia de nucleótidos de un vector de expresión para expresar la proteína F de RSV recombinante del subtipo B humano (cepa 18537) que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensadas a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II (vector RSV_B F(+)FdTHS DSCav1 paH; VRC3799).

SEQ ID NOs: 389-693 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión.

SEQ ID NOs: 694-697 son las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del dominio Foldon modificados.

SEQ ID NOs: 698-697 son las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del dominio Foldon modificados.

SEQ ID NOs: 698-828, 1429-1442 y 1474-1478 son las secuencias de aminoácidos de proteínas F de RSV recombinantes de cadena sencilla.

SEQ ID NOs: 829-1025 y 1456-1468 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV recombinantes enlazadas a un dominio foldon escindible, o no enlazadas a un dominio foldon.

SEQ ID NO: 1026 es la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV sin sustituciones estabilizantes de prefusión.

SEQ ID NOs: 901-968 son las secuencias de aminoácidos de las proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión.

SEQ ID NOs: 1027-1088 y 1099-1428 son las secuencias de aminoácidos de los inmunógenos del sitio Ø mínimo que se describen en el Ejemplo 14.

COORDENADAS ESTRUCTURALES

Las coordenadas atómicas de la estructura cristalina de la proteína F de RSV unida por D25 Fab se citan en la Tabla 1 de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nº 61/780,910, presentada el 13 de marzo de 2013. Estas coordenadas atómicas de la estructura cristalina de la proteína F de RSV unida por D25 Fab también se depositan como el Nº de Acceso 4JHW del Banco de Datos de Proteínas como se presenta en esa base de datos el 1 de mayo de 2013.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se define en las reivindicaciones. La glicoproteína F de RSV es una proteína de fusión tipo I que facilita la fusión de membranas virales y celulares (Walsh y Hruska, *J. Virol.,* 47, 171 (1983)). Después de la síntesis inicial, F de RSV adopta una conformación de prefusión metaestable que almacena la energía de plegamiento, que se libera durante un reordenamiento estructural a una conformación de post-fusión altamente estable después del contacto con las membranas de la célula huésped. Se ha encontrado que tres sitios antigénicos (I, II y IV) en la proteína F de RSV inducen la actividad neutralizante (Arbiza *et al., J. Gen. Virol.,* 73, 2225 (1992); López *et al., J. Virol.,* 72, 6922 (1998); López *et al., J. Virol.,* 64, 927 (1990)), y todos existen en la forma de post-fusión de la proteína F de RSV según se determina por estudios estructurales y biofísicos (McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011); Swanson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 108, 9619 (2011)). La absorción del suero humano con F de RSV de post-fusión, sin embargo, no logra eliminar la mayoría de la actividad neutralizante específica de F, sugiriendo que la forma de prefusión de F de RSV alberga sitios antigénicos neutralizantes novedosos (Magro *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 109, 3089 (2012)).

Previo al trabajo descrito en la presente, una preparación homogénea de proteína F de RSV de prefusión soluble no estuvo disponible, evityo la determinación de la estructura F de prefusión y la identificación de los sitios antigénicos específicos de F de prefusión novedosos. Como se describe en la presente, se identificaron anticuerpos específicos de proteína F de RSV que neutralizan RSV, pero no se unen específicamente a F de RSV de post-fusión, y se obtuvo la estructura tridimensional de F de prefusión, reconocida por estos anticuerpos. Los resultados proporcionados en la presente revelan por primera vez la conformación de prefusión de F de RSV y el mecanismo de neutralización para una categoría de anticuerpos neutralizantes de F de prefusión de RSV notablemente potentes. Utilizyo la estructura tridimensional de F de prefusión como una guía, se construyeron las formas estabilizadas de F de prefusión (antígenos "PreF") y se utilizaron para generar respuestas inmunes neutralizantes de RSV muchas veces mayores que las logradas con los inmunógenos basados en proteína F de

RSV previos.

I. Términos

A menos que se mencione de otra manera, las expresiones y los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos y expresiones comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII,* publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew *et al.*, (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers, (ed.), *Molecular Biology y Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference,* publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

Como se utiliza en la presente, las formas en singulares "un", "uno" y "el", "la" se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto claramente lo indique lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un antígeno" incluye antígenos individuales o plurales y se puede considerar equivalente a la expresión "por lo menos un antígeno". Como se utiliza en la presente, el término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, "que comprende un antígeno" significa "que incluye un antígeno" sin excluir otros elementos. Además, se entiende que cualquiera y todos los tamaños de base o tamaños de aminoácido, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para fines descriptivos, a menos que se indique lo contrario. Aunque se pueden utilizar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, métodos y materiales adecuados particulares se describen en la presente. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de términos y expresiones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes. Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos y expresiones:

5C4: Un anticuerpo monoclonal neutralizante que específicamente se une a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, pero no a la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. El anticuerpo 5C4 incluye regiones variables de la cadena pesada y ligera con las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 1470 y 1471, respectivamente. Como se describe en McLellan et al., Science, 340(6136):1113-7, 2013, 5C4 se une específicamente a un epítopo cuaternario que se encuentra en la proteína F de RSV en su conformación de prefusión, pero no en la conformación de post-fusión. En varias realizaciones, el anticuerpo 5C4 se une específicamente a los antígenos PreF descritos en la presente.

Dominio Variable de la Cadena Pesada de 5C4:

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTFFHWVKQRPEQGLEWIGRIDPADGHTKYDPKFQGKATITADTS SNTAFLQLSSLTSVDTAVYYCATTITAVVPTPYNAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 1470)

Dominio Variable de la Cadena Ligera Kappa de 5C4:

DIVLTQSPASLAVSLGQRTTISCRASESVDSFDNSFIHWYQQKPGQPPKLLIFLASSLESGVPARFSGSGSRTDFT LTIDPVEADDAATYYCQQSNEDPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 1471).

Adyuvante: Un vehículo utilizado para aumentar la antigenicidad. Los adyuvantes incluyen una suspensión de minerales (aluminio, hidróxido de aluminio o fosfato) en la cual se adsorbe el antígeno; o emulsión de agua en aceite, por ejemplo, en la cual la solución de antígeno se emulsiona en aceite mineral (adyuvante incompleto de Freund), algunas veces con la inclusión de micobacterias exterminadas (adyuvante completo de Freund) para potenciar adicionalmente la antigenicidad (inhibe la degradación del antígeno y/o provoca la afluencia de macrófagos). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores (tales como los que incluyen un motivo CpG) también se pueden utilizar como adyuvantes. Los adyuvantes incluyen moléculas biológicas (un "adyuvante biológico"), tales como moléculas coestimuladoras. Adyuvantes ejemplares incluyen IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L, 4-1BBL y agonistas del receptor similar a toll (TLR), tales como agonistas de TLR-9. La persona de experiencia ordinaria en la técnica estará familiarizada con los adyuvantes (véase, *p. ej.,* Singh (ed.) Vaccine Adjuvants y Delivery Systems. Wiley-Interscience, 2007). Los adyuvantes se pueden utilizar en combinación con los antígenos PreF descritos.

Administración: La introducción de una composición en un sujeto mediante una ruta elegida. La administración puede ser local o sistémica. Por ejemplo, si la ruta elegida es intravenosa, la composición (tal como una composición que incluye un inmunógeno descrito) se administra al introducir la composición en una vena del sujeto.

Agente: Cualquier sustancia o cualquier combinación de sustancias que es útil para lograr un fin o resultado; por ejemplo, una sustancia o combinación de sustancias útiles para inhibir la infección por RSV en un sujeto. Agentes incluyen proteínas, moléculas de ácido nucleico, compuestos, moléculas pequeñas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos u otras moléculas de interés, tales como virus, tales como virus recombinantes. Un agente puede incluir un agente terapéutico (tal como un agente anti-RSV), un agente de

diagnóstico o un agente farmacéutico. En algunas realizaciones, el agente es un agente de polipéptido (tal como un polipéptido RSV inmunogénico), o un agente anti-viral. La persona experta entenderá que agentes particulares pueden ser útiles para lograr más de un resultado.

AM22: Un anticuerpo monoclonal neutralizante que específicamente se une a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, pero no a la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. La proteína AM22 y las secuencias de ácidos nucleicos son conocidas, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del anticuerpo AM22 se recogen en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2012/0070446. Como es descrito en el Ejemplo 1, AM22 se une específicamente a un epítopo (incluido en el sitio antigénico Ø) que incluye las posiciones encontradas en la proteína F de RSV en su conformación de prefusión, pero no en la conformación de post-fusión. Este epítopo se incluye dentro de las posiciones 62-69 y 196-209 de F de RSV, y se ubica en el ápice distal a la membrana de la proteína F de RSV en la conformación de prefusión (véase, *p. ej.*, las FIGs. 2B y 9A). Anteriormente a esta divulgación no se conoció que AM22 fuera específico para la conformación de prefusión. En varias realizaciones, el anticuerpo AM22 se une específicamente a los antígenos PreF descritos en la presente.

Sustituciones de aminoácidos: El reemplazo de un aminoácido en un antígeno por un aminoácido diferente o una deleción de un aminoácido. En algunos ejemplos, un aminoácido en un antígeno está sustituido con un aminoácido de una proteína homóloga.

Animal: Un organismo vertebrado o invertebrado multi-celular vivo, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos. El término mamífero incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De manera similar, el término **"sujeto"** incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, tales como primates no humanos. De esta manera, la administración a un sujeto puede incluir la administración a un sujeto humano. Ejemplos no limitantes de sujetos veterinarios incluyen animales domesticados (tales como gatos y perros), ganado (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, ovejas y cabras) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, gerbos, cobayas y primates no humanos).

Anticuerpo: Un polipéptido que en la naturaleza es codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que específicamente se une a y reconoce un analito (tal como un antígeno o inmunógeno) tal como una proteína F de RSV o fragmento antigénico de la misma. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como el sinnúmero de genes de región variable de inmunoglobulina. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente, incluye fragmentos de anticuerpo producidos, por ejemplo, mediante la modificación de anticuerpos completos y mediante la síntesis de novo utilizyo metodologías de ADN recombinante.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas y como un número de fragmentos de anticuerpo bien caracterizados. Por ejemplo, Fabs, Fvs y Fvs de cadena sencilla (SCFvs) que se unen a la proteína F de RSV, serían agentes de unión específicos de la proteína F de RSV. Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de éstas bien conocidas en la técnica, tales como fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'$_2$, proteínas Fv de cadena sencilla ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la cual una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina se unen por un enlazador, mientras que en dsFvs, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas modificadas por ingeniería genética tales como anticuerpos quiméricos (tales como anticuerpos de murino humanizados), anticuerpos de heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, *Pierce Catalog y Hybook,* 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology,* 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Los fragmentos de anticuerpo se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producido por la digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenido al tratar el anticuerpo completo con pepsina, seguido por la reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')2, el fragmento del anticuerpo obtenido al tratar el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente; (4) F(ab')2, un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos conjuntamente por dos enlaces disulfuro; (5) Fv, un fragmento modificado por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (6) anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, enlazadas por un enlazador de polipéptido adecuado tal como una molécula de cadena sencilla genéticamente condensada.

Típicamente, una inmunoglobulina que se produce de forma natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases de cadena pesada principales (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Los anticuerpos descritos pueden ser conmutados en clase.

Cada una de las cadenas pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también son conocidas como "dominios"). En varias realizaciones, los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera se combinan específicamente para unirse al antígeno. En realizaciones adicionales, solamente se requiere el dominio variable de la cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélido que se producen de forma natural que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera (véase, *p. ej.,* Hamers-Casterman *et al., Nature,* 363:446-448, 1993; Sheriff *et al., Nat. Struct. Biol.,* 3:733-736, 1996). Los dominios variables de la cadena ligera y pesada contienen una región de "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDRs" (véase, p. ej., Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health y Human Services, 1991). Las secuencias de las regiones marco de las diferentes cadenas ligeras y pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDRs en el espacio tridimensional.

Las CDRs son principalmente responsables de la unión a un epítopo de un antígeno. Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar fácilmente utilizyo cualquier número de esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al., ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani et al., (JMB 273.927-948, 1997; esquema de numeración "Chothia") y Lefranc et al., ("IMGT unique numbering for immunoglobulin y T cell receptor variable domains y Ig superfamily V-like domains", Dev. Comp. Immunol., 27:55-77, 2003; esquema de numeración "IMGT").

A las CDRs de cada una de las cadenas se las alude típicamente como CDR1, CDR2 y CDR3 (desde el extremo N al extremo C) y también se identifican típicamente por la cadena en la cual se ubica la CDR particular. De esta manera, una V_H CDR3 se ubica en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el cual se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el cual se encuentra. A las CDRs de la cadena ligera se las alude algunas veces como CDR L1, CDR L2 y CDR L3. A las CDRs de la cadena pesada se las alude algunas veces como CDR H1, CDR H2 y CDR H3.

Antígeno: Un compuesto, una composición o una sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de célula T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral o celular específica, incluyendo los inducidos por antígenos heterólogos, tales como las proteínas F de RSV recombinantes descritas.

Ejemplos de antígenos incluyen, pero no están limitados a polipéptidos, péptidos, lípidos, polisacáridos, combinaciones de los mismos (tales como glicopéptidos) y determinantes antigénicas que contienen ácidos nucleicos, tales como las reconocidas por una célula inmune. En algunos ejemplos, los antígenos incluyen péptidos derivados de un patógeno de interés, tal como RSV. En ejemplos específicos, un antígeno se deriva de RSV, tal como un antígeno que incluye una proteína F de RSV modificada estabilizada en una conformación de prefusión. "Epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno a la cual responde las células B y/o T.

Agente anti-RSV: Un agente que específicamente inhibe RSV de células replicantes o infectantes. Ejemplos no limitantes de agentes anti-RSV incluyen el anticuerpo monoclonal palivizumab (SYNAGIS®; Medimmune, Inc.), y el fármaco anti-viral de molécula pequeña ribavirina (fabricado por muchas fuentes, *p. ej.,* Warrick Pharmaceuticals, Inc.).

Coordenadas Atómicas o Coordenadas Estructurales: Las coordenadas matemáticas derivadas de ecuaciones matemáticas relacionadas con los patrones obtenidos en la difracción de un haz monocromático de rayos X por los átomos (centros de dispersión) tal como un antígeno, o un antígeno en complejo con un anticuerpo. En algunos ejemplos ese antígeno puede ser la proteína F de RSV (por ejemplo estabilizada en una conformación de prefusión mediante la unión a un anticuerpo específico de prefusión, o mediante la introducción de modificaciones estabilizantes) en un cristal. Los datos de difracción se utilizan para calcular un mapa de densidad de electrones de la unidad de repetición del cristal. Los mapas de densidad de electrones se utilizan para establecer las posiciones de los átomos individuales dentro de la celda unitaria del cristal. En un ejemplo, la expresión "coordenadas estructurales" se refiere a las coordenadas cartesianas derivadas de ecuaciones matemáticas relacionadas con los patrones obtenidos en la difracción de un haz monocromático de rayos X, tal como por los átomos de una proteína F de RSV en forma de cristal.

Aquellos de experiencia ordinaria en la técnica entienden que un conjunto de coordenadas estructurales determinada por la cristalografía de rayos X no está sin error típico. Para el propósito de esta divulgación, cualquier conjunto de coordenadas estructurales que tienen una desviación cuadrática media de los átomos de la cadena principal de la proteína (N, Cα, C y O) menor que aproximadamente 1.0 Angstroms cuyo se superponen, tal como aproximadamente 0.75 o aproximadamente 0.5 o aproximadamente 0.25 Angstroms, utilizyo los átomos de la cadena principal, serán (en ausencia de una declaración explícita al contrario)

considerados idénticos.

Sustitución de aminoácido de relleno de cavidad: Una sustitución de aminoácido que rellena una cavidad dentro del núcleo de proteína de la proteína F de RSV, por ejemplo una cavidad presente en un protómero de la proteína F de RSV, o una cavidad entre protómeros de la proteína F de RSV. Las cavidades son esencialmente huecos dentro de una proteína plegada en donde no están presentes aminoácidos o cadenas laterales de aminoácidos. En varias realizaciones, una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad se introduce para rellenar una cavidad en el núcleo de la proteína F de RSV presente en la conformación de prefusión de proteína F de RSV que colapsa (p. ej., tiene un volumen reducido) después de la transición a la conformación de post-fusión.

Permutante Circular: Una proteína recombinante modificada en la cual las conexiones entre diferentes regiones de una estructura terciaria de proteína se modifica, de modo que el orden relativo de las diferentes regiones en la secuencia primaria se altera, pero se preserva la colocación de las regiones en la estructura terciaria. Por ejemplo, con una lámina antiparalela de 4 cadenas, con las cadenas A, B, C y D, que tiene las siguientes extremos N y C y conectividad,

Nterm - cadena A - enlazador - cadena B - enlazador - cadena C - enlazador - cadena D - Cterm,

permutaciones circulares de las 4 cadenas, A, B, C y D al alterar la conexión del enlazador entre las cadenas incluiría la Permutación con los extremos N y C alterados:

Nterm - cadena C - enlazador - cadena D - enlazador - cadena A - enlazador - cadena B – Cterm,

Permutación con el extremo N preservado:

Nterm - cadena A - enlazador - cadena D - enlazador - cadena C - enlazador - cadena B – Cterm,

Permutación con el extremo C preservado:

Nterm - cadena C - enlazador - cadena B - enlazador - cadena A - enlazador - cadena D - Cterm.

Acción de Contacto: Colocación en asociación física directa; incluye la forma tanto sólida como líquida. La acción de contacto incluye el contacto entre una molécula y otra molécula, por ejemplo el aminoácido en la superficie de un polipéptido, tal como un antígeno, que hace contacto con otro polipéptido, tal como un anticuerpo. El contacto también incluye la administración, tal como la administración de un antígeno descrito a un sujeto por una ruta elegida.

Control: Un patrón de referencia. En algunas realizaciones, el control es una muestra de control negativa obtenida de un paciente sano. En otras realizaciones, el control es una muestra de control positiva obtenida de un paciente al que se ha diagnosticado una infección por RSV. En todavía otras realizaciones, el control es un control histórico o valor de referencia estándar o intervalo de valores (tal como una muestra de control previamente testada, tal como un grupo de pacientes de RSV con pronóstico o efecto conocido, o grupos de muestras que representan valores de referencia o normales).

Una diferencia entre una muestra de ensayo y un control puede ser un incremento o, a la inversa, una disminución. La diferencia puede ser una diferencia cualitativa o una diferencia cuantitativa, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa. En algunos ejemplos, una diferencia es un incremento o una disminución, con relación a un control, de por lo menos aproximadamente 5 %, tal como por lo menos aproximadamente 10 %, por lo menos aproximadamente 20 %, por lo menos aproximadamente 30 %, por lo menos aproximadamente 40 %, por lo menos aproximadamente 50 %, por lo menos aproximadamente 60 %, por lo menos aproximadamente 70 %, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 100 %, por lo menos aproximadamente 150 %, por lo menos aproximadamente 200 %, por lo menos aproximadamente 250 %, por lo menos aproximadamente 300 %, por lo menos aproximadamente 350 %, por lo menos aproximadamente 400 %, por lo menos aproximadamente 500 % o mayor que 500 %.

D25: Un anticuerpo monoclonal neutralizante que específicamente se une a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, pero no a la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. La proteína D25 y las secuencias de ácidos nucleicos son conocidas, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del anticuerpo D25 se recogen en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos. Nº 2010/0239593; véase también, Kwakkenbos *et al., Nat. Med.,* 16:123-128, 2009). Como es descrito en el Ejemplo 1, D25 se une específicamente a un epítopo cuaternario (incluido en el sitio antigénico Ø) encontrado en la proteína F de RSV en su conformación de prefusión, pero no en la conformación de post-fusión. Este epítopo se incluye dentro de las posiciones 62-69 y 196-209 de F de RSV, y se ubica en el ápice distal a la membrana de la proteína F de RSV en la conformación de prefusión (véanse, *p. ej.,* las FIGs. 2B y

9A). Anteriormente a esta divulgación no se conoció que D25 fuera específico para la conformación de prefusión de la proteína F de RSV). En varias realizaciones, el anticuerpo D25 se une específicamente a los antígenos PreF descritos en la presente.

Variante degenerada y variante conservativa: Un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye una secuencia que es degenerada como resultado del código genético. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un antígeno descrito, o un anticuerpo que específicamente se une a un antígeno descrito, que incluye una secuencia que es degenerada como resultado del código genético. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales son especificados por más de un codón. Por lo tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degeneradas siempre que esté sin modificar la secuencia de aminoácidos del antígeno o anticuerpo que se une al antígeno codificado por la secuencia de nucleótidos. Debido a la degeneración del código genético, un número grye de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos el aminoácido arginina. De esta manera, en cada posición en la que una arginina se especifica dentro de una secuencia codificante de una proteína, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar la proteína codificada. Variaciones de este tipo de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativas. Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos en la presente que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa. Un experto reconocerá que cada uno de los codones en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica por técnicas estándares. Por consiguiente, cada "variación silenciosa" de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada una de las secuencias descritas.

Un experto ordinario reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o suprimen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (por ejemplo menor que 5 %, en algunas realizaciones menor que 1 %) en una secuencia codificada son variaciones conservativas en las que las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes seis grupos contiene cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas del uno para el otro:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

No todas las posiciones de residuos dentro de una proteína tolerarán una sustitución de otra manera "conservativa". Por ejemplo, si un residuo de aminoácido es esencial para una función de la proteína, incluso una sustitución de otra manera conservativa puede interrumpir la actividad, por ejemplo el enlace específico de un anticuerpo a un epítopo diana se puede interrumpir por una mutación conservativa en el epítopo diana.

Epítopo: Un determinante antigénico. Son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas en una molécula que son antigénicos, de modo que inducen una respuesta inmune específica, por ejemplo, un epítopo es la región de un antígeno a la cual responden las células B y/o T. Un anticuerpo une un epítopo antigénico particular, tal como un epítopo de una proteína F de RSV, por ejemplo, un epítopo D25 o AM22 presente en la conformación de prefusión de la proteína F de RSV.

Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente tras la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye típicamente por lo menos 3, y más usualmente, por lo menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear. Epítopos también pueden incluir modificación de post-traducción de los aminoácidos, tal como la glicosilación N-enlazada.

En una realización, las células T responden al epítopo, cuyo el epítopo se presenta en conjunción con una

molécula MHC. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan típicamente tras la exposición a disolventes desnaturalizantes mientras que los epítopos formados mediante el plegamiento terciario se pierden típicamente tras el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye típicamente por lo menos 3, y más usualmente, por lo menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear.

Un "epítopo diana" es un epítopo particular de un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo de interés tal como un anticuerpo monoclonal. En algunos ejemplos, un epítopo diana incluye los residuos de aminoácido que hacen contacto con el anticuerpo de interés, de modo que el epítopo diana se puede seleccionar por los residuos de aminoácidos determinados que están en contacto con el anticuerpo de interés.

Cantidad eficaz: Una cantidad de agente, tal como un antígeno PreF o ácido nucleico que codifica un antígeno PreF u otro agente que es suficiente para generar una respuesta deseada, tal como una respuesta inmune a la proteína F de RSV, o una reducción o eliminación de un signo o síntoma de una afección o enfermedad, tal como la infección por RSV. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para inhibir la replicación viral o para alterar de forma mensurable los síntomas externos de la infección viral. En general, esta cantidad será suficiente para inhibir de forma mensurable la replicación del virus (por ejemplo RSV) o la infectividad. Cuyo se administra a un sujeto, una dosificación generalmente será utilizada de modo que logrará las concentraciones en el tejido diana (por ejemplo, en el tejido respiratorio) que ha demostrado que logran la inhibición *in vitro* de la replicación viral. En algunos ejemplos, una "cantidad eficaz" es una que trata (incluyendo la profilaxis) uno o más síntomas y/o causas implícitas de cualquiera de un trastorno o enfermedad, por ejemplo para tratar la infección por RSV. En un ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad terapéuticamente eficaz. En un ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad que previene uno o más signos o síntomas de una enfermedad o afección particular del desarrollo, tal como uno o más signos o síntomas asociados con la infección por RSV.

Expresión: Traducción de un ácido nucleico en una proteína. Las proteínas se pueden expresar y permanecer siendo intracelulares, llegar a ser un componente de la membrana de la superficie celular, o ser secretadas en la matriz extracelular o el medio.

Secuencias de Control de la Expresión: Secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a las cuales está enlazada operativamente. Las secuencias de control de la expresión están enlazadas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuyo las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores apropiados, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (ATG) enfrente de un gen que codifica la proteína, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcta de ese gen para permitir la traducción apropiada de ARNm y codones de parada. La expresión "secuencias de control" pretende incluir, en un mínimo, componentes cuya presencia puede influenciar la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias conductoras y las secuencias de participantes en la fusión. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor.

Un promotor es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen aquellos elementos de promotor que son suficientes para hacer que la expresión del gen dependiente del promotor sea controlable para señales o agentes específicos del tipo de célula, específicos del tejido o inducibles por señales o agentes externos; elementos de este tipo se pueden ubicar en las regiones 5' o 3' del gen. Están incluidos promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo Bitter *et al., Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987). Por ejemplo, cuyo se clona en sistemas bacterianos, se pueden utilizar promotores inducibles, tales como pL de bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. En una realización, cuyo se clonan en sistemas de células de mamíferos, se pueden utilizar los promotores derivados del genoma de las células de mamífero (tal como el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (tal como la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5 K de virus vaccinia). Promotores producidos por el ADN recombinante o técnicas de síntesis también se pueden utilizar para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

Un polinucleótido se puede insertar en un vector de expresión que contiene una secuencia de promotor, que facilita la transcripción eficiente de la secuencia genética insertada en el huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

Ferritina: Una proteína que almacena hierro y lo libera de un modo controlado. La proteína es producida por casi todos los organismos vivos. Ferritina se ensambla en un complejo de proteína globular que en algunos casos consiste en 24 subunidades de proteína. En algunos ejemplos, la ferritina se utiliza para formar antígenos que presentan nanopartículas en su superficie, por ejemplo un antígeno de RSV tales como los antígenos de

proteína F de RSV descritos estabilizados en una conformación de prefusión.

Dominio Foldon: Una secuencia de aminoácidos que de forma natural forma una estructura trimérica. En algunos ejemplos, un dominio Foldon se puede incluir en la secuencia de aminoácidos de un antígeno de proteína F de RSV descrito estabilizado en una conformación de prefusión de modo que el antígeno formará un trímero. En un ejemplo, un dominio Foldon es el dominio Foldon T4 recogido como SEQ ID NO: 351 (GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTF). Varias realizaciones incluyen un dominio Foldon que se puede escindir de una proteína purificada, por ejemplo mediante la incorporación de un sitio de escisión de trombina adyacente al dominio Foldon que se puede utilizar para fines de escisión.

Glicoproteína (gp): Una proteína que contiene cadenas de oligosacáridos (glicanos) fijadas covalentemente a cadenas laterales de polipéptido. El carbohidrato está fijado a la proteína en una modificación co-traduccional o post-traduccional. Este proceso es conocido como glicosilación. En proteínas que tienen segmentos que se extienden extracelularmente, los segmentos extracelulares están frecuentemente glicosilados. Las glicoproteínas son a menudo proteínas de membrana integral importantes, en donde desempeñan una función en las interacciones de célula-célula. En algunos ejemplos, una glicoproteína es una glicoproteína de RSV, tal como el antígeno de proteína F de RSV estabilizada en una conformación de prefusión o un fragmento inmunogénico del mismo.

Sitio de glicosilación: Una secuencia de aminoácidos en la superficie de un polipéptido, tal como una proteína, que aloja la fijación de un glicano. Un sitio de glicosilación N-enlazado es la secuencia de triplete de NX(S/T), en la cual N es asparagina, X es cualquiera de los residuos excepto prolina y (S/T) es un residuo de serina o treonina. Un glicano es un polisacárido u oligosacárido. El glicano también se puede utilizar para aludir a la porción de carbohidrato de un glicoconjugado, tal como una glicoproteína, un glicolípido o un proteoglicano.

Proteínas homólogas: Proteínas que tiene una estructura y función similares, por ejemplo, proteínas de dos o más especies o cepas virales que tiene estructura y función similares en las dos o más especies o cepas virales. Por ejemplo, una proteína F de RSV de A de RSV es una proteína homóloga a una proteína F de RSV a partir de RSV bovino. Las proteínas homólogas comparten características de plegamiento de proteínas similares y se pueden considerar homólogos estructurales.

Las proteínas homólogas comparten típicamente un alto grado de conservación de la secuencia, tal como por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, o por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % de conservación de la secuencia, y un alto grado de identidad de secuencia, tal como por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, o por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 % de identidad de secuencia.

Células huésped: Células en las cuales un vector se puede propagar y expresar su ADN. La célula puede ser procariótica o eucariótica. La expresión también incluye cualquier progenie de la célula huésped objeto. Se entiende que toda la progenie no puede ser idéntica a la célula de origen, puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Sin embargo, una progenie de este tipo se incluye cuyo se utiliza la expresión "célula huésped".

Inmunógeno: Una proteína o una porción de la misma que es capaz de inducir una respuesta inmune en un mamífero, tal como un mamífero infectado o en riesgo de infección con un patógeno. La administración de un inmunógeno puede conducir a la inmunidad protectora y/o inmunidad proactiva contra un patógeno de interés. En algunos ejemplos, un inmunógeno incluye un antígeno PreF descrito.

Respuesta inmune: Una respuesta de una célula del sistema inmune, tal como una célula B, célula T o monocito, a un estímulo. En una realización, la respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En una realización, una respuesta inmune es una respuesta de célula T, tal como una respuesta de CD4+ o una respuesta de CD8+. En otra realización, la respuesta es una respuesta de célula B, y da como resultado la producción de anticuerpos específicos.

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

Composición inmunogénica: Una composición que comprende un antígeno que induce una respuesta inmune, tal como una respuesta CTL mensurable contra el virus que expresa el antígeno, o una respuesta de célula B mensurable (tal como la producción de anticuerpos) contra el antígeno. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, antígenos de polipéptidos) o epítopos antigénicos. Una composición inmunogénica también puede incluir uno o más componentes adicionales capaces de inducir o potenciar una respuesta inmune, tal como un excipiente, soporte y/o adyuvante. En determinados casos, las

composiciones inmunogénicas se administran para inducir una respuesta inmune que protege al sujeto contra los síntomas o afecciones inducidos por un patógeno. En algunos casos, los síntomas o la enfermedad provocados por un patógeno se previene (o se reduce o se mejora) al inhibir la replicación del patógeno (*p. ej.,* RSV) después de la exposición del sujeto al patógeno. En un ejemplo, una "composición inmunogénica" incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, que induce una respuesta CTL mensurable contra el virus que expresa la proteína F de RSV, o induce una respuesta de célula B mesurable (tal como la producción de anticuerpos) contra la proteína F de RSV. Además, se refiere a ácidos nucleicos aislados que codifican un antígeno, tal como un ácido nucleico que se puede utilizar para expresar el antígeno (y, por lo tanto, ser utilizado para inducir una respuesta inmune contra ese polipéptido).

Para el uso *in vitro*, una composición inmunogénica puede incluir un antígeno o ácido nucleico que codifica un antígeno. Para uso *in vivo,* la composición inmunogénica incluirá típicamente la proteína, el péptido inmunogénico o el ácido nucleico en soportes farmacéuticamente aceptables, y/u otros agentes. Cualquier péptido particular, tal como la proteína F de RSV descrita estabilizada en una conformación de prefusión o un ácido nucleico que codifica una proteína F de RSV descrita estabilizada en una conformación de prefusión, se puede testar fácilmente en cuanto a su habilidad para inducir una respuesta de CTL o de células B mediante ensayos reconocidos en la técnica. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir adyuvantes, que son bien conocidos para un experto en la técnica.

Condiciones inmunológicamente reactivas: Incluye la referencia a condiciones que permiten que un anticuerpo creado contra un epítopo particular se una a ese epítopo a un grado detectablemente más grye que, y/o a la exclusión sustancial de la unión a sustancialmente todos los otros epítopos. Las condiciones inmunológicamente reactivas son dependientes del formato de la reacción de unión de anticuerpo y típicamente son las utilizadas en protocolos de inmunoensayo o las condiciones encontradas *in vivo.* Las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos son "condiciones fisiológicas" que incluyen la referencia a condiciones (tales como temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o una célula de mamífero. Si bien se reconoce que algunos órganos se someten a condiciones extremas, el entorno intra-organismo e intracelular es normalmente de aproximadamente pH 7 (tal como de pH 6.0 a pH 8.0, más típicamente pH 6.5 a 7.5), contiene agua como el disolvente predominante y existe a una temperatura superior a 0 °C e inferior a 50 °C. La osmolaridad está dentro del intervalo que es favorable para la viabilidad celular y la proliferación.

Sonda inmunológica: Una molécula que se puede utilizar para la selección de anticuerpos a partir de sueros que se dirigen contra un epítopo o antígeno específico, incluyendo del suero del paciente humano. En algunos ejemplos, las proteínas F de RSV descritas estabilizadas en una conformación de prefusión se pueden utilizar como sondas inmunológicas en la selección tanto positiva como negativa de anticuerpos específicos para la proteína F de RSV en una conformación de prefusión.

Superficie inmunogénica: Una superficie de una molécula, por ejemplo la proteína F de RSV, capaz de inducir una respuesta inmune. Una superficie inmunogénica incluye las características que definen esa superficie, por ejemplo la conformación tridimensional y la carga de superficie. En algunos ejemplos, una superficie inmunogénica se define por los aminoácidos en la superficie de una proteína o péptido que están en contacto con un anticuerpo, tal como un anticuerpo neutralizante, cuyo la proteína y el anticuerpo se unen conjuntamente. Un epítopo diana incluye una superficie inmunogénica. La superficie inmunogénica es sinónima a la superficie antigénica.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: La inhibición del desarrollo completo de una enfermedad o afección, por ejemplo, en un sujeto quien está en riesgo de padecer una enfermedad, tal como la infección por RSV. "Tratamiento" se refiere a la intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que haya comenzado a desarrollarse. El término "mejora", con referencia a una enfermedad o afección patológica, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso se puede evidenciar, por ejemplo, por un inicio retardado de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una mejora en la salud total o bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos para la enfermedad particular. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto quien no exhibe signos de una enfermedad o exhibe solamente signos tempranos con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología.

El término "reduce" es un término relativo, de modo que un agente reduce una respuesta o afección si la respuesta o afección se disminuye cuantitativamente después de la administración del agente, o si se disminuye después de la administración del agente, en comparación con un agente de referencia. De manera similar, el término "previene" no significa necesariamente que un agente elimina completamente la respuesta o afección, siempre que se elimine por lo menos una característica de la respuesta o afección. Por lo tanto, una composición inmunogénica que reduce o previene una infección o una respuesta, tal como una respuesta patológica, *p. ej.,* enfermedad viral potenciada por vacuna, puede, pero no necesariamente, eliminar completamente una infección o respuesta de este tipo, siempre que la infección o respuesta se disminuya de forma mensurable, por ejemplo,

en al menos aproximadamente 50 %, tal como en al menos aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o incluso en aproximadamente 90 % (es decir a 10 % o menos que) la infección o respuesta en ausencia del agente, o en comparación con un agente de referencia.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una proteína, por ejemplo un antígeno PreF descrito o un ácido nucleico que codifica un antígeno de este tipo) se ha separado o purificado sustancialmente lejos de otros componentes biológicos, tales como otros componentes biológicos en los cuales se presenta el componente de forma natural, tales como otros ADN, ARN y proteínas cromosómicos y extracromosómicos. Las proteínas, los péptidos y los ácidos nucleicos que se han "aislado" incluyen proteínas purificadas por métodos de purificación estándares. El término también abarca proteínas o péptidos preparados por la expresión recombinante en una célula huésped, así como las proteínas, los péptidos y las moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas. Aislado no requiere una pureza absoluta, y puede incluir proteína, péptido o moléculas de ácido nucleico que están por lo menos 50 % aisladas, tal como por lo menos 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9 % aisladas. Los antígenos PreF descritos en la presente (por ejemplo, una proteína F de RSV recombinante aislada estabilizada en una conformación de prefusión) se aíslan de las proteínas F de RSV en una conformación de post-fusión, por ejemplo, están por lo menos 80 % aisladas, por lo menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9% aisladas de las proteínas F de RSV en una conformación de post-fusión. En varias realizaciones, el antígeno PreF se separa sustancialmente de las proteínas F de RSV que no incluyen el sitio antigénico Ø y/o no se unen específicamente por un anticuerpo monoclonal específico de prefusión (tal como D25 o AM22), por ejemplo, el antígeno PreF puede estar por lo menos 80 % aislado, por lo menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9% aislado de las proteínas F de RSV que no incluyen el sitio antigénico Ø y/o y no se enlazan específicamente por el anticuerpo monoclonal específico de prefusión, tal como D25 o AM22.

K_d: La constante de disociación para una interacción dada, tal como una interacción polipéptido-ligyo o una interacción anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, para la interacción bimolecular de un anticuerpo (tal como D25) y un antígeno (tal como la proteína F de RSV), es la concentración de los componentes individuales de la interacción bimolecular dividida por la concentración del complejo. Métodos para determinar la K_d de una interacción de anticuerpo:antígeno son familiares para la persona de experiencia ordinaria en la técnica.

Marca: Un compuesto o una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente a otra molécula para facilitar la detección de esa molécula. Ejemplos no limitantes, específicos, de marcas incluye etiquetas fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos. En algunos ejemplos, un antígeno PreF descrito se marca con una marca detectable. En algunos ejemplos, la marca se fija al antígeno descrito o ácido nucleico que codifica un antígeno de ese tipo.

Enlazador: Una molécula bi-funcional que se puede utilizar para enlazar dos o más moléculas en una molécula contigua, por ejemplo, para enlazar una molécula de soporte a un polipéptido inmunogénico. Ejemplos no limitantes de enlazadores peptídicos incluyen un enlazador peptídico $(G_4S)_1$, $(G_4S)_2$ o un $(G_4S)_3$.

Los términos "conjugar", "ensamblar", "unir" o "enlazar" pueden referirse a la creación de dos moléculas en una molécula contigua; por ejemplo, enlazar dos de otros polipéptidos en un polipéptido contiguo, o fijar covalentemente una molécula de soporte u otra molécula a un polipéptido inmunogénico, tal como la proteína F de RSV recombinante como se describe en la presente. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción, por ejemplo, entre la porción de polipéptido inmunogénica y la molécula de soporte, de modo que haya un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula.

MPE8: Un anticuerpo monoclonal neutralizante que se une específicamente a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, pero no a la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. Como se describe en Corti et al. (Nature, 501(7467)439-443, 2013, el anticuerpo MPE8 se une a un epítopo que se encuentra en las conformaciones de pre- pero no de post-fusión de la proteína F de RSV. El epítopo MPE8 no es parte del sitio antigénico Ø. Las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera se recogen como SEQ ID NOs: 1472 y 1473, respectivamente.

Antígeno nativo o secuencia nativa: Un antígeno o secuencia que no ha sido modificado mediante la mutación selectiva, por ejemplo, la mutación selectiva para enfocar la antigenicidad del antígeno a un epítopo diana. Al antígeno nativo o a la secuencia nativa también se les alude como antígeno de tipo salvaje o secuencia de tipo salvaje.

Ácido nucleico: Un polímero compuesto de unidades de nucleótido (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales que se producen de forma natural relacionadas y análogos que no se producen de forma natural sintéticos de los mismos) enlazados a través de enlaces fosfodiéster, variantes estructurales que se producen de forma natural relacionadas y análogos que no se producen de forma natural sintéticos de los mismos. De esta manera, la expresión incluye polímeros de nucleótidos en los cuales los nucleótidos y los enlaces entre éstos incluyen análogos sintéticos que no se producen de forma natural, tal como, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos

de 2-O-metilo, péptido-ácidos nucleicos (PNAs) y similares. Polinucleótidos de este tipo se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizyo un sintetizador de ADN automatizado. El término "oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, generalmente de no más de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuyo una secuencia de nucleótidos se representa por una secuencia de ADN (*es decir,* A, T, G, C) ésta también incluye una secuencia de ARN (*es decir,* A, T, G, C) en la cual "U" reemplaza a "T".

"Nucleótido" incluye, pero no se limita a un monómero que incluye una base enlazada a un azúcar, tal como una pirimidina, purina o análogos sintéticos de las mismas, o una base enlazada a un aminoácido, como en un péptido-ácido nucleico (PNA). Un nucleótido es un monómero en un polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos se refiere a la secuencia de bases en un polinucleótido.

La notación convencional se utiliza en la presente para describir secuencias de nucleótidos: el extremo del lado izquierdo de una secuencia de nucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; a la dirección del lado izquierdo de una secuencia de nucleótidos de doble cadena se la alude como la dirección 5'. A la dirección de la adición 5' a 3' de nucleótidos a transcripciones de ARN nacientes se la alude como la dirección de transcripción. A la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se la alude como la "cadena de codificación"; a las secuencias en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm transcrito de ese ADN y que se ubican en 5' al extremo 5' de la transcripción de ARN se las alude como "secuencias aguas arriba"; a las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' con respecto al extremo 3' de la transcripción de ARN codificante se las alude como "secuencias aguas abajo".

"ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, en forma de una cadena sencilla o de doble cadena.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de las secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen ya sea una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas que resultan de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción de ARNm producido por ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto a la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos de la cual es idéntica a la secuencia de ARNm y usualmente se proporciona en listados de secuencias, y la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc se puede aludir como que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique de otra manera, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones. En algunos ejemplos, un ácido nucleico codifica un antígeno PreF descrito.

Operativamente enlazado: Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente enlazada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuyo la primera secuencia de ácido nucleico está dispuesta en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente enlazado a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente enlazadas son contiguas y, en los casos en los que es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura.

Anticuerpo específico de prefusión: Un anticuerpo que específicamente se une a la proteína F de RSV en una conformación de prefusión, pero no se une específicamente a la proteína F de RSV en una conformación de post-fusión. Anticuerpos específicos de prefusión ejemplares incluyen los anticuerpos D25, AM22, 5C4 y MPE8.

Polipéptido: Cualquier cadena de aminoácidos, sin considerar la longitud o modificación post-traduccional (tal como glicosilación o fosforilación). "Polipéptido" se aplica a polímeros de aminoácidos que incluyen polímeros de aminoácidos que se producen de forma natural y polímeros de aminoácidos que no se producen de forma natural, así como en los cuales uno o más residuos de aminoácidos es un aminoácido no natural, por ejemplo, un mimético químico artificial de un aminoácido que se producen de forma natural correspondiente. Un "residuo" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un polipéptido por un enlace de amida o mimético de enlace de amida. Un polipéptido tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxi terminal (C-terminal). "Polipéptido" se utiliza indistintamente con péptido o proteína, y se utiliza indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido.

Una polipéptido contiguo de cadena sencilla de residuos de aminoácido puede incluir múltiples polipéptidos. Por ejemplo, el polipéptido F_0 de RSV incluye un péptido de señal N-terminal, un polipéptido F_2, un polipéptido pep27 y un polipéptido F_1 que incluye el dominio extracelular F_1, el dominio de transmembrana y una cola citosólica. Además, en algunas realizaciones, una proteína F de RSV recombinante es una proteína F de RSV de cadena sencilla que incluye un polipéptido F_2 de RSV enlazado a un polipéptido F_1 de RSV mediante un enlazador peptídico.

En muchos casos, un polipéptido se pliega en una estructura tridimensional específica, y puede incluir residuos de aminoácidos expuestos en la superficie y residuos de aminoácidos no expuestos en la superficie. En algunos casos, una proteína puede incluir múltiples polipéptidos que se pliegan conjuntamente en una unidad funcional. Por ejemplo, la proteína F de RSV está compuesta de heterodímeros F_1/F_2 que se trimerizan en una proteína multimérica.

"Residuos de aminoácidos expuestos en la superficie" son aquellos aminoácidos que tienen un cierto grado de exposición en la superficie de la proteína, por ejemplo de modo que puedan entrar en contacto con el disolvente cuyo la proteína está en solución. En cambio, los aminoácidos no expuestos en la superficie son aquellos residuos de aminoácidos que no se exponen en la superficie de la proteína, de modo que no entran en contacto con la solución cuyo la proteína está en solución. En algunos ejemplos, los residuos de aminoácidos no expuestos en la superficie son parte del núcleo de proteína.

Un "**núcleo de proteína**" es el interior de una proteína plegada, que está sustancialmente libre de exposición al disolvente, tal como el disolvente en forma de moléculas de agua en solución. Típicamente, el núcleo de proteína está compuesto predominantemente de aminoácidos hidrófobos o apolares. En algunos ejemplos, un núcleo de proteína puede contener aminoácidos cargados, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y/o lisina. La inclusión de aminoácidos cargados no compensados (un aminoácido cargado compensado puede estar en forma de un puente de sal) en el núcleo de proteína puede conducir a una proteína desestabilizada. Es decir, una proteína con una T_m menor que una proteína similar sin un aminoácido cargado no compensado en el núcleo de proteína. En otros ejemplos, un núcleo de proteína puede tener una cavidad dentro del núcleo de proteína. Las cavidades son esencialmente huecos dentro de una proteína plegada donde los aminoácidos o cadenas laterales de aminoácidos no están presentes. Cavidades de este tipo también pueden desestabilizar una proteína con respecto a una proteína similar sin una cavidad. Por lo tanto, cuyo se crea una forma estabilizada de una proteína, puede ser ventajoso sustituir los residuos de aminoácido dentro del núcleo con el fin de llenar las cavidades presentes en la proteína de tipo salvaje.

Los aminoácidos en un péptido, polipéptido o proteína generalmente se unen químicamente de manera conjunta mediante enlaces amida (CONH). Adicionalmente, los aminoácidos se pueden unir conjuntamente por otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácido pueden incluir CH_2NH-, $-CH_2S$-, $-CH_2-CH_2$-, -CH=CH-- (cis y trans), $-COCH_2$--, $-CH(OH)CH_2$- y $-CHH_2SO$- (estos y otros se pueden encontrar en Spatola, en Chemistry y Biochemistry of Amino Acids, Peptides, y Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo de 1983), Vol. 1, Número 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci pp. 463-468, 1980; Hudson, *et al., Int J Pept Prot Res* 14:177-185, 1979; Spatola *et al., Life Sci* 38:1243-1249, 1986; Harm *J. Chem. Soc Perkin Trans.* 1307-314, 1982; Almquist *et al., J. Med. Chem.* 23:1392-1398, 1980; Jennings-White *et al., Tetrahedron Lett* 23:2533, 1982; Holladay *et al., Tetrahedron. Lett* 24:4401-4404, 1983; y Hruby Life Sci 31:189-199, 1982.

Modificaciones de péptido: Los péptidos, tales como las proteínas F de RSV descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión, se pueden modificar, por ejemplo para incluir una sustitución de aminoácido comparada con una secuencia de proteína RSV nativa, o por una diversidad de técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad y la conformación que los péptidos no modificados, y que tienen opcionalmente otras propiedades deseables. Por ejemplo, los grupos ácido carboxílico de la proteína, ya sea carboxilo-terminal o cadena lateral, se pueden proporcionar en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificado para formar un éster C_1-C_{16}, o se pueden convertir en una amida de la fórmula NR_1R_2, en donde R_1 y R_2 son cada uno independientemente H o alquilo C_1-C_{16}, o se pueden combinar para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea amino-terminal o cadena lateral, pueden estar en forma de una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, tal como las sales de HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o se puede modificar a alquil de C_1-C_{16} o dialquil amino o, además, se pueden convertir en una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales peptídicas se pueden convertir en alcoxi C_1-C_{16} o en un éster C_1-C_{16} utilizyo técnicas bien reconocidas. Los anillos de fenilo y fenólicos de las cadenas laterales peptídicas se pueden sustituir con uno o más átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, o con alquilo C_1-C_{16}, alcoxi C_1-C_{16}, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de ácidos carboxílicos de este tipo. Los grupos metileno de las cadenas laterales peptídicas se pueden extender a alquilenos C_2-C_4 homólogos. Los tioles se pueden proteger con uno cualquiera de un cierto número de grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida.

Soportes farmacéuticamente aceptables: Los soportes farmacéuticamente aceptables de uso son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences,* de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª Edición, 1995, describe composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de los inmunógenos descritos.

En general, la naturaleza del soporte dependerá del modo de administración particular que se emplee. Por

ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden habitualmente fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones de sal equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para composiciones sólidas (*p. ej.,* formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los soportes sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los soportes biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tampón del pH, y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán. En realizaciones particulares, adecuado para la administración a un sujeto el soporte puede ser estéril, y/o puede estar suspendido o contenido de otra manera en una forma de dosificación unitaria que contiene una o más dosis medidas de la composición adecuada para inducir la respuesta inmune anti-RSV deseada. También puede ser acompañada por medicaciones para su uso para fines de tratamiento. La forma de dosificación unitaria puede estar, por ejemplo, en un vial sellado que contiene los contenidos estériles o una jeringa para la inyección en un sujeto, o liofilizado para solubilización subsiguiente y la administración o en una dosificación sólida o de liberación controlada.

Vacunación de cebador-refuerzo: Una inmunoterapia que incluye la administración de una primera composición inmunogénica (la vacuna de inductor) seguido de la administración de una segunda composición inmunogénica (la vacuna de refuerzo) a un sujeto para inducir una respuesta inmune. La vacuna de cebador y/o la vacuna de refuerzo incluyen un vector (tal como un vector viral, vector de ARN o ADN) que expresa el antígeno al cual se dirige la respuesta inmune. La vacuna de refuerzo se administra al sujeto después de la vacuna de inductor; la persona experta entenderá un intervalo de tiempo adecuado entre la administración de la vacuna de cebador y la vacuna de refuerzo, y ejemplos de intervalos de tiempo de este tipo se describen en la presente. En algunas realizaciones, la vacuna de cebador, la vacuna de refuerzo, o tanto la vacuna de cebador como la vacuna de refuerzo incluyen adicionalmente un adyuvante. En un ejemplo no limitante, la vacuna de inductor es una vacuna a base de ADN (u otra vacuna basada en el suministro génico) y la vacuna de refuerzo es una vacuna basada en subunidad de proteínas o basada en nanopartículas de proteína.

Nanopartícula de proteína: Una estructura de forma poliédrica a base de proteína, multi-subunitaria. Las subunidades están cada una compuestas de proteínas o polipéptidos (por ejemplo un polipéptido glicosilado) y, opcionalmente, de una sola o múltiples características de lo siguiente: ácidos nucleicos, grupos prostéticos, compuestos orgánicos e inorgánicos. Ejemplos no limitantes de nanopartículas de proteína incluyen nanopartículas de ferritina (véase, *p. ej.,* Zhang, *Y. Int. J. Mol. Sci,* 12:5406-5421, 2011), nanopartículas de encapsulina (véase, *p. ej.,* Sutter *et al.*, Nature Struct. y Mol. Biol., 15:939-947, 2008), nanopartículas de Azufre Oxigenasa Reductasa (SOR) (véase, *p. ej.,* Urich *et al.,* Science, 311:996-1000, 2006), nanopartículas de lumazina sintasa (véase, *p. ej.,* Zhang *et al., J. Mol. Biol.,* 306:1099-1114, 2001) o nanopartículas de piruvato deshidrogenasa (véase, *p. ej.,* Izard et al., PNAS 96:1240-1245, 1999). Ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa y piruvato deshidrogenasa son proteínas monoméricas que se auto-ensamblan en complejos de proteínas globulares que en algunos casos consisten en 24, 60, 24, 60 y 60 subunidades de proteína, respectivamente. En algunos ejemplos, ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o monómeros de piruvato deshidrogenasa se enlazan a un antígeno descrito (por ejemplo una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión) y se auto-ensamblan en una nanopartícula de proteína que presenta los antígenos descritos en su superficie, que se puede administrar a un sujeto para estimular una respuesta inmune al antígeno.

Recombinante: Un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o tiene una secuencia que se hace mediante una combinación artificial de dos segmentos de otra manera separados de la secuencia. Esta combinación artificial se puede realizar mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Una proteína recombinante es una que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o que tiene una secuencia que se hace mediante una combinación artificial de dos segmentos de otra manera separados de la secuencia. En varias realizaciones, una proteína recombinante es codificada por un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante) que se ha introducido en una célula huésped, tal como una célula bacteriana o eucariótica. El ácido nucleico se puede introducir, por ejemplo, en un vector de expresión que tiene señales capaces de expresar la proteína codificada por el ácido nucleico introducido o el ácido nucleico se puede integrar en el cromosoma de la célula huésped.

Sustitución de aminoácido de reempaquetamiento: Una sustitución de aminoácido que incrementa las interacciones de los residuos vecinos en una proteína, por ejemplo, al potenciar las interacciones hidrófobas o la formación de enlaces hidrógeno, o al reducir las interacciones desfavorables o repulsivas de los residuos vecinos, por ejemplo, al eliminar agrupaciones de residuos similarmente cargados. En varias realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido de reempaquetamiento para incrementar las interacciones de residuos vecinos en la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, que no están en estrecha proximidad en la conformación de post-fusión de F de RSV. Típicamente, la introducción de una sustitución de aminoácido de reempaquetamiento incrementará la T_m de la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, y disminuirá la T_m de la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV.

Virus Sincitial Respiratorio (RSV): Un virus de RNA de cadena sencilla de sentido negativo no segmentado con envoltura de la familia *Paramyxoviridae*. Es la causa más común de bronquiolitis y neumonía entre los niños en su primer año de vida e infecta a casi todos los niños de 3 años. El RSV también provoca infecciones repetidas que incluyen enfermedad del tracto respiratorio inferior grave, que puede ocurrir en cualquier edad, especialmente entre las personas de edad avanzada o aquellas con sistemas cardíacos, pulmonares o inmunes comprometidos. En los Estados Unidos, la bronquiolitis por RSV es la causa principal de hospitalización en niños y es una causa principal de asma y sibilancias a lo largo de toda la infancia (Shay *et al., JAMA,* 282, 1440 (1999); Hall *et al., N. Engl. J. Med.,* 360, 588 (2009)). Globalmente, RSV es el responsable de 66.000-199.000 muertes cada año para niños menores de cinco años (Nair *et al., Lancet,* 375, 1545 (2010)), y representa el 6.7 % de las muertes entre los niños de un mes a un año de edad - más que cualquier otro patógeno individual excepto la malaria (Lozano *et al., Lancet,* 380, 2095 (2013)).

El genoma de RSV es de ~15.000 nucleótidos de longitud e incluye 10 genes que codifican 11 proteínas, incluyendo las glicoproteínas SH, G y F. La proteína F media en la fusión, permitiendo la entrada del virus en el citoplasma de la célula y fomentyo también la formación de sincitia. Se han descrito dos subtipos de cepas de RSV humanas, los subtipos A y B, en base a las diferencias en la antigenicidad de la glicoproteína G. Las cepas de RSV para otras especies también son conocidas, incluyendo el RSV bovino. Secuencias de la cepa de RSV ejemplares son conocidas para la persona de experiencia ordinaria en la técnica. Además, están disponibles varios modelos de infección por RSV humano, incluyendo organismos modelo infectados con hRSV, así como organismos modelo infectados con RSV específico de la especie, tal como el uso de la infección por bRSV en el ganado (véase, *p. ej.,* Bern *et al., Am J, Physiol. Lug. Cell. Mol. Physiol.,* 301: L148-L156, 2011).

Se conocen varios métodos para diagnosticar la infección por RSV, incluyendo el uso de la detección de anticuerpo fluorescente directo (DFA, por sus siglas en inglés), la detección de antígeno rápida cromatográfica y la detección de ARN viral utilizyo RT PCR. La cuantificación de la carga viral se puede determinar, por ejemplo, mediante el Ensayo en Placa, el inmunoensayo enzimático de captura de antígeno (EIA) o la PCR. La cuantificación de los niveles de anticuerpo se puede realizar mediante el ensayo de neutralización específica del subtipo o ELISA. El tratamiento de RSV actual es la administración pasiva del anticuerpo monoclonal palivizumab (SYNAGIS®), que reconoce la proteína F de RSV (Johnson *et al., J. Infect. Dis.,* 176, 1215 (1997); Beeler y van Wyke Coelingh, *J. Virol.,* 63, 2941 (1989)) y reduce la incidencia de la enfermedad grave (The IMpact-RSV Study Group, *Pediatrics,* 102, 531 (1998)). (También véase, *p. ej.,* Nam y Kun (Eds.). Respiratory Syncytial Virus: Prevention, Diagnosis y Treatment. Nova Biomedical Nova Science Publisher, 2011; y Cane (Ed.) Respiratory Syncytial Virus. Elsevier Science, 2007).

Existen varios subtipos de RSV, incluyendo el subtipo A humano, el subtipo B humano y el subtipo bovino. Dentro de los subtipos de RSV, existen cepas individuales de cada uno de los subtipos. Por ejemplo, las SEQ ID NOs: 1-128 proporcionadas en la presente incluyen secuencias de proteína F de RSV para muchas cepas de RSV subtipo A, que (como se muestra en la Tabla 3 más adelante) son altamente homólogas.

Proteína de Fusión (F) de RSV: Una glicoproteína de envoltura de RSV que facilita la fusión de las membranas virales y celulares. En la naturaleza, la proteína F de RSV inicialmente se sintetiza como un único precursor de polipéptido de aproximadamente 574 aminoácidos de longitud, designado F_0. F_0 incluye un péptido de señal N-terminal que dirige la localización al retículo endoplasmático, en donde el péptido señal (aproximadamente los primeros 25 residuos de F_0) se escinde proteolíticamente. Los residuos F_0 restantes se oligomerizan para formar un trímero que se procesa de nuevo proteolíticamente mediante una proteasa celular en dos secuencias de segmentación consenso de furina conservadas (aproximadamente posiciones 109 y 136 de F_0; por ejemplo, $RARR_{109}$ (SEQ ID NO: 124, residuos 106-109) y $RKRR_{136}$ (SEQ ID NO: 124, residuos 133-136) para generar dos fragmentos enlazados de disulfuro, F_1 y F_2. El más pequeño de estos fragmentos, F_2, procede de la porción N-terminal del precursor de F_0 e incluye aproximadamente los residuos 26-109 de F_0. El más grye de estos fragmentos, F_1, incluye la porción C-terminal del precursor F_0 (aproximadamente los residuos 137-574) que incluyen una región extracelular/lumenal (~residuos 137-524), un dominio de transmembrana (~residuos 525-550) y un dominio citoplásmico (~residuos 551-574) en el extremo C.

Tres protómeros F_2-F_1 se oligomerizan en la proteína F madura, la cual adopta una conformación de "prefusión" metaestable que es activada para someterse a un cambio conformacional (a una conformación de "post-fusión") tras el contacto con una membrana de célula diana. Este cambio conformacional expone una secuencia hidrófoba, conocida como el péptido de fusión, que se ubica en el extremo N del polipéptido F_1, y que se asocia con la membrana de célula huésped y fomenta la fusión de la membrana del virus, o una célula infectada, con la membrana de la célula diana.

Se ha identificado un cierto número de anticuerpos neutralizantes que específicamente se unen a los sitios antigénicos en la proteína F de RSV. Estos incluyen anticuerpos monoclonales 131-2a y 2F, que se unen al sitio antigénico I (centrado alrededor del residuo P389); los anticuerpos monoclonales palivizumab y motavizumab, que se unen al sitio antigénico II (centrado alrededor de los residuos 254-277); y anticuerpos monoclonales 101F y mAb19, que se unen al sitio antigénico IV (centrado alrededor de los residuos 429-437).

Proteína F de RSV de cadena sencilla: Una proteína F de RSV recombinante que se expresa como una cadena sencilla de polipéptido que incluye el polipéptido F_1 de RSV y el polipéptido F_2 de RSV. La proteína F de RSV de cadena sencilla se trimeriza para formar un ectodominio de proteína F de RSV. Una proteína F de RSV de cadena sencilla no incluye los sitios de escisión de furina que flanquean el polipéptido pep27 de la proteína F de RSV; por lo tanto, cuyo se produce en células, el polipéptido F_0 no se escinde en los polipéptidos F_1 y F_2 separados. En algunas realizaciones, una proteína F de RSV de cadena sencilla incluye la deleción de los dos sitios de escisión de furina, el polipéptido pep27 y el péptido de fusión. En una realización, la posición 103 o 105 está enlazada a la posición 145 de la proteína de RSV para generar la construcción de cadena sencilla. En varias realizaciones, las porciones restantes de los polipéptidos F_1 y F_2 están unidas por un enlazador, tal como un enlazador de péptido.

Polipéptido F_0 de RSV (F_0): El precursor de la proteína F de RSV, que incluye los aminoácidos de un péptido señal N-terminal, un polipéptido F_2, un polipéptido pep27 y un polipéptido F_1 que incluye el dominio extracelular F_1, el dominio de transmembrana y la cola citosólica. El polipéptido F_0 nativo se procesa proteolíticamente en un sitio de escisión de secuencia señal, y dos sitios de escisión de furina (aproximadamente las posiciona 109 y 136 de F_0, por ejemplo, $RARR_{109}$ (SEQ ID NO: 124, residuos 106-109) y $RKRR_{136}$ (SEQ ID NO: 124, residuos 133-136), que da como resultado los fragmentos F_1 y F_2. Se conocen ejemplos de polipéptidos F_0 de muchos subgrupos de RSV diferentes, incluyendo los subgrupos A, B y bovino, ejemplos de los cuales se recogen en la presente como SEQ ID NOs: 1-128, 129-177, 178-184, respectivamente.

Polipéptido F_1 de RSV (F_1): Una cadena peptídica de la proteína F de RSV. Como se utiliza en la presente, "polipéptido de F_1" se refiere tanto a polipéptidos F_1 nativos como a polipéptidos F_1 que incluyen modificaciones (*p. ej.,* sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos) de la secuencia nativa, por ejemplo, modificaciones diseñadas para estabilizar una proteína F recombinante (incluyendo el polipéptido F_1 modificado) en una conformación de prefusión de proteína F de RSV. F_1 nativo incluye aproximadamente los residuos 137-574 del precursor F_0 de RSV, e incluye (del extremo N al C) una región extracelular/lumenal (~residuos 137-524), un dominio de transmembrana (~residuos 525-550), y un dominio citoplásmico (~residuos 551-574). Varias realizaciones incluyen un polipéptido F_1 modificado de una secuencia F_1 nativa, por ejemplo un polipéptido de F_1 que carece del dominio de transmembrana y citosólico, y/o incluye una o más sustituciones de aminoácidos que estabilizan una proteína F recombinante (que contiene el polipéptido F_1) en una conformación de prefusión. En un ejemplo, la proteína F de RSV descrita incluye un polipéptido F_1 con deleción de los dominios de transmembrana y citosólico, y sustituciones de cisteína en las posiciones 155 y 290. En otro ejemplo, una proteína F de RSV descrita incluye un polipéptido F_1 con deleción de los dominios de transmembrana y citosólico, sustituciones de cisteína en las posiciones 155 y 290, y una sustitución de fenilalanina en la posición 190. En otro ejemplo, una proteína F de RSV descrita incluye un polipéptido F_1 con deleción de los dominios de transmembrana y citosólico, sustituciones de cisteína en las posiciones 155 y 290, una sustitución de fenilalanina en la posición 190 y una sustitución de leucina en la posición 207. En varias realizaciones, el polipéptido F1 incluye un enlace C-terminal a un dominio de trimerización. Se conocen muchos ejemplos de secuencias F_1 nativas, los cuales se proporcionan en la presente como aproximadamente las posiciones 137-524 de SEQ ID NOs: 1-184.

Polipéptido F_2 de RSV (F_2): Una cadena polipeptídica de la proteína F de RSV. Como se utiliza en la presente, "polipéptido F_2" se refiere tanto a polipéptidos F_2 nativos como a polipéptidos F_2 que incluyen modificaciones (*p. ej.,* sustituciones de aminoácidos) de la secuencia nativa, por ejemplo, modificaciones diseñadas para estabilizar una proteína F recombinante (incluyendo el polipéptido F_2 modificado) en una conformación de prefusión de proteína F de RSV. F_2 nativo incluye aproximadamente los residuos 26-109 del precursor F_0 de RSV. En la proteína F de RSV nativa, el polipéptido F_2 se enlaza al polipéptido F_1 mediante dos enlaces disulfuro. Se conocen muchos ejemplos de secuencias F_2 nativas, los cuales se proporcionan en la presente como aproximadamente las posiciones 26-109 de SEQ ID NOs: 1-184.

Polipéptido pep27 de RSV (pep27): Un polipéptido de 27 aminoácidos que se escinde del precursor F_0 durante la maduración de la proteína F de RSV. pep27 está flanqueado por dos sitios de escisión de furina que se escinden por una proteasa celular durante la maduración de la proteína F para generar el polipéptido F_1 y F_2. Se conocen ejemplos de secuencias pep27 nativas, los cuales se proporcionan en la presente como posiciones 110-136 de SEQ ID NOs: 1-184.

Conformación de prefusión de la proteína F de RSV: Una conformación estructural adoptada por la proteína F de RSV antes de la activación del evento fusogénico que conduce a la transición de F de RSV a la conformación de post-fusión y después del procesamiento en una proteína F de RSV madura en el sistema secretorio. La estructura tridimensional de una proteína F de RSV ejemplar en una conformación de prefusión se describe en la presente (véase el Ejemplo 1) y las coordenadas estructurales de la proteína F de RSV ejemplar en una conformación de prefusión unida por el anticuerpo D25 específico de prefusión se proporciona en la Tabla 1. Como se muestra en la presente, la conformación de prefusión de F de RSV es similar en la estructura global a la conformación de prefusión de otros paramixovirus (tal como PIV, véase la FIG. 7), aunque con algunas diferencias significativas. En el estado de prefusión, la proteína F de RSV incluye un sitio antigénico en el ápice

distal a la membrana ("**sitio antigénico Ø**", véase el Ejemplo 1), que incluye los residuos 62-69 y 196-209 de F de RSV, y también incluye los epítopos de los anticuerpos D25 y AM22. Como se utiliza en la presente, una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión se puede unir específicamente por un anticuerpo que es específico para la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, tal como un anticuerpo que específicamente se une a un epítopo dentro del sitio antigénico Ø, por ejemplo, el anticuerpo D25 o AM22. Anticuerpos específicos de prefusión adicionales incluyen los anticuerpos 5C4 y MPE8.

Conformación de post-fusión de la proteína F de RSV: Una conformación estructural adoptada por la proteína F de RSV que no es la conformación de prefusión, y en la cual los extremos N y C de la proteína F de RSV están próximos en un bucle-bucle estable. La conformación de post-fusión de la proteína F de RSV se ha descrito en el nivel atómico (véase, *p. ej.,* McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011; Swanson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A,* 108, 9619, 2011; y las coordenadas estructurales depositadas bajo el Acceso de PDB Nº 3RRR). La conformación de post-fusión de la proteína F de RSV es similar a la conocida para otras glicoproteínas de paramixovirus, incluyendo la proteína F de PIV5. En la conformación de post-fusión, la proteína F de RSV no incluye el sitio antigénico Ø y, por lo tanto, no incluye el epítopo D25 y no se une específicamente por D25 o AM22. La conformación de post-fusión de RSV se produce, por ejemplo, después de la fusión de la proteína F con la membrana de célula. La secuencia de una proteína F de RSV que, cuyo se expresa, puede plegarse en una conformación de post-fusión, se proporciona como SEQ ID NO: 1469.

Antígeno resuperficializado o inmunógeno resuperficializado: Un inmunógeno de polipéptido derivado de un antígeno de tipo salvaje, en el cual los residuos de aminoácido de fuera o exteriores a un epítopo diana se mutan de una manera sistemática para enfocar la inmunogenicidad del antígeno al epítopo diana seleccionado. En algunos ejemplos a un antígeno resuperficializado se le alude como un inmunógeno antigénicamente simulado o antígeno antigénicamente simulado.

Desviación cuadrática media (RMSD): La desviación cuadrática media de los cuadrados de las desviaciones de la media. En varias realizaciones, la RMSD se utiliza como una manera de expresar la desviación o variación de las coordenadas estructurales de una estructura tridimensional de referencia. Este número típicamente se calcula después de la superposición óptima de dos estructuras, como la raíz cuadrada del cuadrado medio de las distancias entre átomos C_α equivalentes. En algunas realizaciones, la estructura tridimensional de referencia incluye las coordenadas estructurales de la proteína F de RSV unida al anticuerpo monoclonal D25, como se recoge en la presente en la Tabla 1.

Identidad/similitud de secuencia: La identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia se puede medir en términos del porcentaje de identidad; cuanto más alto sea el porcentaje, tanto más idénticas serán las secuencias. Los homólogos u ortólogos de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuyo se alinean utilizyo métodos estándares.

Métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineamiento se describen en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene,* 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet *et al., Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang *et al. Computer Appls. en the Biosciences* 8, 155-65, 1992; y Pearson *et al., Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul *et al., J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990, presenta una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencia y cálculos de homología.

Una vez alineado, el número de concordancias se determina contyo el número de posiciones en donde está presente un residuo de nucleótido o de aminoácido idéntico en ambas secuencias. El porciento de identidad de secuencia se determina al dividir el número de concordancias ya sea entre la longitud de la secuencia recogida en la secuencia identificada, o por una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o residuos de aminoácido consecutivos de una secuencia recogida en una secuencia identificada), seguido de multiplicar el valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia peptídica que tiene 1166 concordancias cuyo se alinea con una secuencia de ensayo que tiene 1554 aminoácidos es 75.0 por ciento idéntica a la secuencia de ensayo (1166÷1554*100=75.0). El valor de porcentaje de identidad de la secuencia se redondea al décimo más cercano. Por ejemplo, 75.11, 75.12, 75.13 y 75.14 se redondean hacia abajo a 75.1, mientras que 75.15, 75.16, 75.17, 75.18 y 75.19 se redondean hacia arriba a 75.2. El valor de longitud siempre será un número entero.

La Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST) de NCBI (Altschul *et al., J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional para Información de Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para el uso en relación con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizyo este programa está disponible en el sitio de la red NCBI en Internet.

Homólogos y variantes de un polipéptido se caracterizan típicamente por la posesión de por lo menos

aproximadamente 75 %, por ejemplo por lo menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia contada sobre el alineamiento de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de interés. Las proteínas con una similitud incluso mayor a las secuencias de referencia mostrarán identidades de porcentaje incrementadas cuyo se estima por este método, tal como por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % de identidad de secuencia. Cuyo menos de la secuencia completa esté siendo comparada en cuanto a la identidad de secuencia, los homólogos y variantes típicamente poseerán por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de por lo menos 85 % o por lo menos 90 % o 95 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Métodos para determinar la identidad de secuencia respecto a ventanas cortas de este tipo están disponibles en el sitio de la red de NCBI en Internet. Un experto en la técnica apreciara que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan para guía únicamente; es completamente posible que los homólogos fuertemente significativos se podrían obtener de modo que caigan fuera de los intervalos proporcionados.

Para la comparación de las secuencias de ácido nucleico, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuyo se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se utilizan parámetros del programa de error. Métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede realizar, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4ª ed, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2012) y Ausubel *et al.,* (En Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, a través del suplemento 104, 2013). Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360, 1987. El método utilizado es similar al método descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153, 1989. Utilizyo PILEUP, una secuencia de referencia se compara con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de relación de identidad de secuencia utilizyo los siguientes parámetros: ponderación de hueco de error (3.00), ponderación de longitud de hueco de error (0.10) y huecos de extremo ponderados. PILEUP se puede obtener del paquete de software de análisis de secuencia GCG, p. ej., versión 7.0 (Devereaux et al., *Nuc. Acids Res.* 12:387-395, 1984.

Otro ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son el algoritmo BLAST y el algoritmo BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990 y Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1977. El software para realizar los análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para Información de Biotecnológica (ncbi.nlm.nih.gov). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como errores una longitud de palabra (W) de 11, alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. El programa BLASTP (para secuencias de aminoácidos) utiliza como errores una longitud de palabra (W) de 3, y expectativa (E) de 10 y la matriz de registro BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989). Un oligonucleótido es una secuencia de polinucleótido lineal de hasta aproximadamente 100 bases de nucleótidos de longitud.

Otros indicios de similitud de secuencia entre dos ácidos nucleicos es la habilidad para hibridar. Cuanto más similares sean las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más rigurosas serán las condiciones en las cuales se hibridarán. La rigurosidad de las condiciones de hibridación es dependiente de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros del entorno. Por lo tanto, las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación de elección y de la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. Generalmente, la temperatura de hibridación y la intensidad iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C a 20 °C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica en una intensidad iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una intensidad iónica y pH definidos) en la cual el 50 % de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente igualada. Las condiciones para la hibridación de ácido nucleico y el cálculo de rigurosidades se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I: Theory y Nucleic Acid Preparation,* Laboratory Techniques in Biochemistry y Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993; y Ausubel *et al. Short Protocols in Molecular Biology,* 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Como se utiliza en la presente, la referencia a "por lo menos 80 % de identidad" se refiere a "por lo menos 80 %,

por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o incluso 100 % de identidad" con una secuencia de referencia especificada.

Péptido Señal: Una secuencia de aminoácidos corta (*p. ej.,* aproximadamente 18-25 aminoácidos de longitud) que dirige proteínas secretorias o de membrana recientemente sintetizadas hacia y a través de las membranas (por ejemplo, la membrana del retículo endoplasmático). Los péptidos señal se ubican típicamente en el extremo N de un polipéptido y se eliminan por peptidasas señal después de que el polipéptido haya cruzado la membrana. Secuencias de péptido señal contienen típicamente tres características estructurales comunes: una región básica polar N-terminal (región n), un núcleo hidrófobo y una región-c hidrófila). Secuencias de péptido señal ejemplares se recogen como los residuos 1-25 de SEQ ID NOs: 1-182 (péptidos señal de la proteína F de RSV del RSV A, B y bovino).

Unir específicamente: Cuyo se hace referencia a la formación de un complejo de proteína de anticuerpo:antígeno, se hace referencia a una reacción de unión que determina la presencia de una proteína diana, péptido o polisacárido (por ejemplo, una glicoproteína), en presencia de una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biologías. Por lo tanto, bajo las condiciones designadas, un anticuerpo se une preferentemente a una proteína, péptido o polisacárido diana particular (tal como un antígeno presente en la superficie de un patógeno, por ejemplo F de RSV) y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas o polisacáridos presentes en la muestra o en el sujeto. Un anticuerpo que específicamente se une a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV (p. ej., un anticuerpo que se une específicamente al sitio antigénico Ø) no se une específicamente a la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. Launión específica se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Con referencia a un complejo de anticuerpo:antígeno o Fab:antígeno, la unión específica del antígeno y anticuerpo tiene una K_d (o K_d aparente) menor que aproximadamente 10^{-6} molar, tal como menor que aproximadamente 10^{-7} molar, 10^{-6} molar, 10^{-9} o incluso menor que aproximadamente 10^{-10} molar.

Proteína soluble: Una proteína capaz de disolverse en un líquido acuoso a temperatura ambiente y permanecer disuelta. La solubilidad de una proteína puede cambiar dependiendo de la concentración de la proteína en el líquido a base de agua, la condición tamponadora del líquido, la concentración de otros solutos en el líquido, por ejemplo las concentraciones de sal y de proteína, y el calor del líquido. En varias realizaciones, una proteína soluble es una que se disuelve a una concentración de por lo menos 0.5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (pH 7.4) a temperatura ambiente y permanece disuelta durante por lo menos 48 horas.

Agente terapéutico: Un compuesto químico, molécula pequeña, u otra composición, tal como molécula de ácido nucleico, capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuyo se administra apropiadamente a un sujeto.

Cantidad terapéuticamente eficaz de la cantidad eficaz: La cantidad de agente, tal como una composición de antígeno o inmunogénica descrita que contiene un antígeno descrito, que es suficiente para prevenir, tratar (incluyendo la profilaxis), reducir y/o mejorar los síntomas y/o causas subyacentes de cualquiera de un trastorno o enfermedad, por ejemplo para prevenir, inhibir y/o tratar la infección por RSV. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para reducir o eliminar un síntoma de una enfermedad, tal como la infección por RSV. Por ejemplo, ésta puede ser la cantidad necesaria para inhibir la replicación viral o para alterar de forma mensurable los síntomas externos de la infección viral. En general, esta cantidad será suficiente para inhibir de forma mensurable la replicación o infectividad del virus (por ejemplo, RSV). Cuyo se administra a un sujeto, generalmente se utilizará una dosificación de modo que logre concentraciones en el tejido diana que han demostrado que logran la inhibición *in vitro* de la replicación viral. Se entiende que para obtener una respuesta inmune protectora contra un patógeno se pueden requerir múltiples administraciones de la composición inmunogénica. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una dosis fraccionaria que contribuye en combinación con administraciones previas o subsiguientes para alcanzar una respuesta inmune protectora.

Dominio de transmembrana: Una secuencia de aminoácidos que se inserta en una bicapa lipídica, tal como la bicapa lipídica de una célula o virus o partícula similar a virus. Un dominio de transmembrana se puede utilizar para anclar un antígeno a una membrana. En algunos ejemplos un dominio de transmembrana es un dominio de transmembrana de proteína F de RSV. Dominios de transmembrana F de RSV ejemplares son familiares para una persona de experiencia ordinaria en la técnica, y se proporciona en la presente. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de los dominios de transmembrana F de RSV ejemplares se proporcionan como aproximadamente las posiciones 525-550 de SEQ ID NOs: 1-183.

Transformada: Una célula transformada es una célula en la cual una molécula de ácido nucleico se ha introducido mediante técnicas de biología molecular. Como se utiliza en la presente, el término transformación abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico podría ser introducida en una célula de este tipo, incluyendo la transfección con vectores virales, la transformación con vectores de plásmido y la introducción de ADN mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

Vacuna: Una composición farmacéutica que induce una respuesta inmune profiláctica o terapéutica en un sujeto. En algunos casos, la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora. Típicamente, una vacuna induce una respuesta inmune específica de antígeno para un antígeno de un patógeno, por ejemplo un patógeno viral, o a un constituyente celular correlacionado con una afección patológica. Una vacuna puede incluir un polinucleótido (tal como un ácido nucleico que codifica un antígeno descrito), un péptido o polipéptido (tal como un antígeno descrito), un virus, una célula o uno o más constituyentes celulares.

Vector: Una molécula de ácido nucleico como se introduce en una célula huésped, para de esta manera producir una célula huésped transformada. Los vectores de ADN recombinantes son vectores que tienen ADN recombinante. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables u otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores virales son vectores de ADN recombinantes que tienen por lo menos algunas secuencias de ácido nucleico derivadas de uno o más virus.

Un vector viral deficiente de replicación que requiere complementación de una o más regiones del genoma viral requerido para la replicación, como resultado de, por ejemplo, una deficiencia en por lo menos una función del gen esencial de replicación. Por ejemplo, de manera que el vector viral no se replica en células huésped típicas, especialmente aquellas en un paciente humano que podría ser infectado por el vector viral en el curso de un método terapéutico. Ejemplos de vectores virales deficientes de replicación y sistemas para su uso son conocidos en la técnica e incluyen; por ejemplo vectores LCVM deficientes de replicación (véase, *p. ej.,* la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nº 2010/0297172) y vectores adenovirales deficientes de replicación (véase, *p. ej.,* la Publicación de Solicitud de PCT Nº WO2000/00628).

Virus: Un virus consiste esencialmente en un núcleo de ácido nucleico rodeado por un recubrimiento de proteína, y tiene la capacidad de replicarse solamente dentro de una célula viva. "Replicación viral" es la producción de virus adicional por la ocurrencia de por lo menos un ciclo de vida viral. Un virus puede derivar las funciones normales de las células huésped, provocyo que la célula se comporte de una manera determinada por el virus. Por ejemplo, una infección viral puede dar como resultado una célula que produce una citoquina, o que responde a una citoquina, cuyo la célula no infectada normalmente no lo hace. En algunos ejemplos, un virus es un patógeno.

Partícula similar a virus (VLP): Una cubierta viral, no replicante, derivada de cualquiera de varios virus. Las VLPs están generalmente compuestas de una o más proteínas virales, tales como, pero no limitadas a aquellas proteínas a las que se alude como proteínas de la cápsida, recubrimiento, cubierta, superficie y/o de envoltura, o polipéptidos que forman partículas derivados de estas proteínas. Las VLPs pueden formarse espontáneamente tras la expresión recombinante de la proteína en un sistema de expresión apropiado. Métodos para producir VLPs particulares son conocidos en la técnica. La presencia de VLPs después de la expresión recombinante de proteínas virales se puede detectar utilizyo técnicas convencionales conocidas en la técnica, tal como mediante la microscopía electrónica, caracterización biofísica y similares. Además, las VLPs se pueden aislar por técnicas conocidas, *p. ej.*, la centrifugación de gradiente de densidad e identificar por la formación de bya de densidad característica. Véase, por ejemplo, Baker *et al.,* (1991) *Biophys. J.* 60:1445-1456; y Hagensee *et al.* (1994) *J. Virol.* 68:4503-4505; Vincente, *J Invertebr Pathol,* 2011; Schneider-Ohrum y Ross, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 354: 53073, 2012).

II. Descripción de varias realizaciones

Se describe en la presente que la proteína F de RSV se somete a un reordenamiento estructural notable entre sus conformaciones de pre- y post-fusión (véase el Ejemplo 1, más adelante). Como se muestra en la FIG. 2B, la región N-terminal del polipéptido F_1 en la conformación de prefusión (correspondiente en parte al lóbulo distal a la membrana mostrado en la FIG. 2A) incluye las estructuras helicoidales $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\alpha 4$ y lámina beta indicadas, mientras que la región correspondiente del extremo N del polipéptido F_1 en la estructura de post-fusión incluye una estructura helicoidal $\alpha 5$ extendida. Además, la región C-terminal del polipéptido F_1 en la conformación de prefusión (correspondiente en parte al lóbulo próximo de membrana mostrado en la FIG. 2A) incluye las estructuras de lámina beta $\beta 22$, $\alpha 9$ y $\beta 23$ y helicoidales indicadas, mientras que la región C-terminal correspondiente del polipéptido F_1 en la estructura de conformación de post-fusión incluye una estructura helicoidal $\alpha 10$ extendida. Por lo tanto, los lóbulos distales a la membrana y proximales a la membrana de la proteína F de RSV en su conformación de prefusión incluyen varios elementos estructurales distintos que están ausentes de las regiones correspondientes de la proteína F de RSV en su conformación de post-fusión. Las posiciones de aminoácidos (y secuencias) correspondientes a estas regiones están resaltadas en gris en la FIG. 2, incluyendo las posiciones 137-216 y 461-513 del polipéptido F_1.

Se proporcionan antígenos de proteína F de RSV que se estabilizan o "bloquean" en una conformación de prefusión, denominados "antígenos PreF". Utilizyo el diseño guiado por estructura, las posiciones de los polipéptidos F_1 y F_2 de RSV se fijan como objetivo para la modificación (*p. ej.,* sustitución de aminoácidos) para

impedir o prevenir la transición de la proteína F de RSV de una conformación de pre- a post-fusión. Antígenos de este tipo tienen utilidad, por ejemplo, como inmunógenos para inducir una respuesta neutralizante a la proteína F de RSV.

A. Proteínas F de RSV Nativas

Proteínas F de RSV nativas de diferentes grupos de RSV, así como secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas y métodos de este tipo, son conocidas. Por ejemplo, la secuencia de varias proteínas F_0 de RSV del subtipo A, B y precursoras bovinas se proporcionan como SEQ ID NOs: 1-184. El Identificador de GenInfo (gi) y el número de acceso correspondiente para cada una de estas secuencias, así como el grupo RSV correspondiente se proporcionan en la Tabla 3:

Tabla 3. Secuencias de proteínas F de RSV del Subtipo A, B y bovino ejemplares

SEQ ID	Subtipo	Accesso	SEQ ID	Subtipo	Accesso
1	A	>gi|113472470|gb|ABI35685.1	93	A	>gi|346683047|gb|AEO45919.1
2	A	>gi|46405966|gb|AAS93651.1	94	A	>gi|46405974|gb|AAS93655.1
3	A	>gi|346682949|gb|AEO45830.1	95	A	>gi|46405976|gb|AAS93656.1
4	A	>gi|392301680|gb|AFM55244.1	96	A	>gi|346683069|gb|AEO45939.1
5	A	>gi|392301896|gb|AFM55442.1	97	A	>gi|135320|sp|PI1209.2
6	A	>gi|392301692|gb|AFM55255.1	98	A	>gi|1912295|gb|AAC57027.1
7	A	>gi|392301728|gb|AFM55288.1	99	A	>gi|9629375|ref|NP_044596.1
8	A	>gi|392976459|gb|AFM95385.1	100	A	>gi|21263086|gb|AAM44851.1
9	A	>gi|392976475|gb|AFM95400.1	101	A	>gi|41734695|gb|AFX60127.1
10	A	>gi|21689583|gb|AAM68157.1	102	A	>gi|417347009|gb|AFX60156.1
11	A	>gi|21689587|gb|AAM68160.1	103	A	>gi|29290043|gb|AAO72325.1
12	A	>gi|346682981|gb|AEO45859.1	104	A	>gi|138252|sp|P12568.1
13	A	>gi|352962949|gb|AEQ63444.1	105	A	>gi|226438|prf||1512372A
14	A	>gi|353441614|gb|AEQ98752.1	106	A	>gi|37674744|gb|AAQ97026.1
15	A	>gi|392301740|gb|AFM55299.1	107	A	>gi|37674754|gb|AAQ97031.1
16	A	>gi|346682971|gb|AEO45850.1	108	A	>gi|37674746|gb|AAQ97027.1
17	A	>gi|346682992|gb|AEO45869.1	109	A	>gi|37674748|gb|AAQ97028.1
18	A	>gi|346683003|gb|AEO45879.1	110	A	>gi|37674750|gb|AAQ97029.1
19	A	>gi|346683036|gb|AEO45909.1	111	A	>gi|37674752|gb|AAQ97030.1
20	A	>gi|21689579|gb|AAM68154.1	112	A	>gi|146738079|gb|ABQ42594.1
21	A	>gi|326578296|gb|ADZ95777.1	113	A	>gi|403379|emb|CAA81295.1
22	A	>gi|330470871|gb|AEC32087.1	114	A	>gi|226838116|gb|ACO83302.1
23	A	>gi|346683058|gb|AEO45929.1	115	A	>gi|326578304|gb|ADZ95781.1
24	A	>gi|392301644|gb|AFM55211.1	116	A	>gi|326578306|gb|ADZ95782.1
25	A	>gi|392301656|gb|AFM55222.1	117	A	>gi|326578308|gb|ADZ95783.1
26	A	>gi|392301776|gb|AFM55332.1	118	A	>gi|326578310|gb|ADZ95784.1
27	A	>gi|46405962|gb|AAS93649.1	119	A	>gi|326578312|gb|ADZ95785.1
28	A	>gi|326578298|gb|ADZ95778.1	120	A	>gi|60549171|gb|AAX23994.1
29	A	>gi|392301872|gb|AFM55420.1	121	A	>gi|226838109|gb|ACO83297.1
30	A	>gi|346682960|gb|AEO45840.1	122	A	>gi|352962877|gb|AEQ63378.1
31	A	>gi|346683080|gb|AEO45949.1	123	A	>gi|346683014|gb|AEO45889.1
32	A	>gi|227299|prf||1701388A/1-574	124	A	>gi|138251|sp|P03420.1|
33	A	>gi|352962996|gb|AEQ63487.1	125	A	>gi|1695263|gb|AAC55970.1
34	A	>gi|352963032|gb|AEQ63520.1	126	A	>gi|61211|emb|CAA26143.1
35	A	>gi|46405970|gb|AAS93653.1	127	A	>gi|226838114|gb|ACO83301.1
36	A	>gi|392976437|gb|AFM95365.1	128	A	>gi|352963080|gb|AEQ63564.1
37	A	>gi|392976449|gb|AFM95376.1	129	B	>gi|109689536|dbj|BAE96918.1
38	A	>gi|352962805|gb|AEQ63312.1	130	B	>gi|380235900|gb|AFD34266.1
39	A	>gi|346340362|gb|AEO23051.1	131	B	>gi|401712638|gb|AFP99059.1
40	A	>gi|352962829|gb|AEQ63334.1	132	B	>gi|401712648|gb|AFP99064.1
41	A	>gi|352962865|gb|AEQ63367.1	133	B	>gi|380235886|gb|AFD34259.1
42	A	>gi|392302028|gb|AFM55563.1	134	B	>gi|326578302|gb|ADZ95780.1
43	A	>gi|392302016|gb|AFM55552.1	135	B	>gi|326578294|gb|ADZ95776.1
44	A	>gi|417346971|gb|AFX60137.1	136	B	>gi|326578300|gb|ADZ95779.1
45	A	>gi|41734705|gb|AFX60173.1	137	B	>gi|380235892|gb|AFD34262.1
46	A	>gi|392301812|gb|AFM55365.1	138	B	>gi|46405984|gb|AAS93660.1
47	A	>gi|29290039|gb|AAO72323.1	139	B	>gi|46405986|gb|AAS93661.1
48	A	>gi|29290041|gb|AAO72324.1	140	B	>gi|46405990|gb|AAS93663.1

49	A	>gi|262479010|gb|ACY68435.1	141	B	>gi|46405992|gb|AAS93664.1
50	A	>gi|330470867|gb|AEC32085.1	142	B	>gi|345121421|gb|AEN74946.1
51	A	>gi|392301704|gb|AFM55266.1	143	B	>gi|417347137|gb|AFX60215.1
52	A	>gi|392301716|gb|AFM55277.1	144	B	>gi|380235888|gb|AFD34260.1
53	A	>gi|392301800|gb|AFM55354.1	145	B	>gi|346340378|gb|AEO23054.1
54	A	>gi|345548062|gb|AEO12131.1	146	B	>gi|384872848|gb|AFI25262.1
55	A	>gi|346340367|gb|AEO23052.1	147	B	>gi|380235890|gb|AFD34261.1
56	A	>gi|352962889|gb|AEQ63389.1	148	B	>gi|46405978|gb|AAS93657.1
57	A	>gi|353441606|gb|AEQ98748.1	149	B	>gi|46405982|gb|AAS93659.1
58	A	>gi|353441604|gb|AEQ98747.1	150	B	>gi|352963104|gb|AEQ63586.1
59	A	>gi|353441608|gb|AEQ98749.1	151	B	>gi|352963128|gb|AEQ63608.1
60	A	>gi|353441616|gb|AEQ98753.1	152	B	>gi|352963164|gb|AEQ63641.1
61	A	>gi|353441620|gb|AEQ98755.1	153	B	>gi|46405996|gb|AAS93666.1
62	A	>gi|353441624|gb|AEQ98757.1	154	B	>gi|41734713l|gb|AFX60212.1
63	A	>gi|409905594|gb|AFV46409.1	155	B	>gi|417347135|gb|AFX60214.1
64	A	>gi|409905610|gb|AFV46417.1	156	B	>gi|417347145|gb|AFX60219.1
65	A	>gi|417346953|gb|AFX60128.1	157	B	>gi|380235898|gb|AFD34265.1
66	A	>gi|417347079|gb|AFX60187.1	158	B	>gi|352963116|gb|AEQ63597.1
67	A	>gi|417346955|gb|AFX60129.1	159	B	>gi|401712640|gb|AFP99060.1
68	A	>gi|417346967|gb|AFX60135.1	160	B	>gi|352963152|gb|AEQ63630.1
69	A	>gi|417346979|gb|AFX60141.1	161	B	>gi|401712642|gb|AFP99061.1
70	A	>gi|417346993|gb|AFX60148.1	162	B	>gi|417347133|gb|AFX60213.1
71	A	>gi|417346999|gb|AFX60151.1	163	B	>gi|417347147|gb|AFX60220.1
72	A	>gi|417347043|gb|AFX60169.1	164	B	>gi|41734715l|gb|AFX60222.1
73	A	>gi|417347105|gb|AFX60200.1	165	B	>gi|417347169|gb|AFX60231.1
74	A	>gi|417347107|gb|AFX60201.1	166	B	>gi|41734717l|gb|AFX60232.1
75	A	>gi|392301788|gb|AFM55343.1	167	B	>gi|417347175|gb|AFX60234.1
76	A	>gi|409905578|gb|AFV46401.1	168	B	>gi|46405988|gb|AAS93662.1
77	A	>gi|409905596|gb|AFV46410.1	169	B	>gi|138250|sp|P13843.1
78	A	>gi|353441622|gb|AEQ98756.1	170	B	>gi|2582041|gb|AAB82446.1
79	A	>gi|409905582|gb|AFV46403.1	171	B	>gi|9629206|ref|NP_056863.1
80	A	>gi|417347109|gb|AFX60202.1	172	B	>gi|38230490|gb|AAR14266.1
81	A	>gi|409905602|gb|AFV46413.1	173	B	>gi|326578292|gb|ADZ95775.1
82	A	>gi|409905604|gb|AFV46414.1	174	B	>gi|345121416|gb|AEN74944.1
83	A	>gi|417347121|gb|AFX60208.1	175	B	>gi|345121418|gb|AEN74945.1
84	A	>gi|409905614|gb|AFV46419.1	176	B	>gi|46405994|gb|AAS93665.1
85	A	>gi|409905616|gb|AFV46420.1	177	B	>gi|380235896|gb|AFD34264.1
86	A	>gi|417346973|gb|AFX60138.1	178	Bovino	>gi|138247|sp|P22167.1
87	A	>gi|417346997|gb|AFX60150.1	179	Bovino	>gi|3451386|emb|CAA76980.1
88	A	>gi|417347021|gb|AFX60162.1	180	Bovino	>gi|17939990|gb|AAL49399.1
89	A	>gi|417347085|gb|AFX60190.1	181	Bovino	>gi|9631275|ref|NP_048055.1
90	A	>gi|425706126|gb|AFX95851.1	182	Bovino	>gi|94384139|emb|CAI96787.1
91	A	>gi|392301836|gb|AFM55387.1	183	Bovino	>gi|425678|gb|AAB28458.1
92	A	>gi|392301992|gb|AFM55530.1	184	Bovino	>gi|17940002|gb|AAL49410.1

La proteína F de RSV exhibe conservación de secuencia notable a través de los subtipos de RSV (véase la Tabla 3, que muestran la identidad de secuencia emparejada promedio a través de los subtipos y los segmentos de proteína F). Por ejemplo, los subtipos A y B de RSV comparten un 90 % de identidad de secuencia, y los subtipos A y B de RSV cada uno comparten 81 % de identidad de secuencia con la proteína F de bRSV, a través de la molécula precursora F_0. Dentro de los subtipos de RSV la identidad de secuencia F_0 es incluso mayor, por ejemplo, dentro de cada uno de los subtipos A, B y bovino de RSV, la proteína precursora F_0 de RSV tiene ~98 % de identidad de secuencia. Casi todas las proteínas precursoras F_0 de RSV identificadas son de aproximadamente 574 aminoácidos en longitud, con diferencias menores en la longitud típicamente debido a la longitud de la cola citoplásmica C-terminal. La identidad de secuencia a través de las proteínas F de RSV se ilustra en la Tabla 4:

Tabla 4. Identidad de secuencia de la proteína F de RSV

Subtipo de RSV	hRSV A (SEQ NOs: 1-128)	hRSV B (SEQ NOs: 129-177)	hRSV (SEQ NOs: 178-184)
F_0 (posiciones 1-574)			
hRSV A (SEQ NOs: 1-128)	98 %	-	-

hRSV B (SEQ NOs: 129-177)	90 %	99 %	-
RSV Bovino (SEQ NOs: 178-184)	81 %	81 %	98 %
F_2 (posiciones 26-109)			
hRSV A (SEQ NOs: 1-128)	98 %	-	-
hRSV B (SEQ NOs: 129-177)	93 %	99 %	-
RSV Bovino (SEQ NOs: 178-184)	77 %	77 %	98 %
F_1 (posiciones 137-513)			
hRSV A (SEQ NOs: 1-128)	99 %	-	-
hRSV B (SEQ NOs: 129-177)	95 %	>99 %	-
RSV Bovino (SEQ NOs: 178-184)	91 %	92 %	99 %

A la vista de la conservación de las secuencias F de RSV, la persona de experiencia ordinaria en la técnica puede fácilmente comparar las posiciones de aminoácido entre diferentes secuencias F de RSV nativas, para identificar las posiciones de aminoácido F de RSV correspondientes entre diferentes cepas y subtipos de RSV. Por ejemplo, a través de casi todas las proteínas precursoras F_0 de RSV nativas identificadas, los sitios de escisión de furina caen dentro de las mismas posiciones de aminoácido. Por lo tanto, la conservación de las secuencias de proteína F de RSV a través de las cepas y los subtipos permite el uso de una secuencia F de RSV de referencia para la comparación de aminoácidos en posiciones particulares en la proteína F de RSV. Para los fines de esta divulgación (a menos que el contexto lo indique de otra manera), las posiciones de aminoácido de la proteína F de RSV se dan con referencia al polipéptido precursor de proteína F_0 de referencia recogido como SEQ ID NO: 124 (correspondiente a GENBANK® Nº de Acceso P03420 como está presente en GENBANK® el 28 de febrero de 2013).

B. Antígenos PreF

Se describen en la presente antígenos aislados que incluyen una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión ("antígenos PreF") mediante sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L (en comparación con una proteína F de RSV nativa recogida como una de SEQ ID Nos. 1-184). Los antígenos PreF contienen una proteína F de RSV recombinante o fragmento de la misma que se ha modificado de una forma nativa para incrementar la inmunogenicidad. Por ejemplo, las proteínas F de RSV recombinantes descritas se han modificado de la secuencia de RSV nativa para ser estabilizadas en una conformación de prefusión. La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciara que los antígenos PreF descritos son útiles para inducir respuestas inmunogénicas en animales vertebrados (tales como mamíferos, por ejemplo, seres humanos y ganado) a RSV (por ejemplo, RSV A, RSV B o RSV bovino). Por lo tanto, en varias realizaciones, los antígenos descritos son inmunógenos.

El anticuerpo D25 reconoce un epítopo cuaternario que incluye múltiples protómeros de la proteína F de RSV. Este epítopo está contenido dentro de un sitio antigénico ("sitio antigénico Ø") ubicado en el ápice distal a la membrana de la glicoproteína F de RSV (véase, *p. ej.,* FIG. 1C), cuyo está en una conformación de prefusión. Si bien los elementos estructurales secundarios de este epítopo permanecen principalmente sin cambios entre las conformaciones F de pre- y post-fusión, su orientación relativa cambia sustancialmente, pivotyo la hélice $\alpha 4$ ~180° con relación a la cadena $\beta 2$ en las conformaciones de pre- y post-fusión (véase, *p. ej.,* la FIG. 3B). Los cambios conformacionales en la estructura de la proteína F de RSV entre las conformaciones de pre- y post-fusión determinan la presencia del epítopo D25 en la proteína F de RSV. Por consiguiente, en varias realizaciones, un antígeno PreF que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión se puede identificar al determinar la unión específica del anticuerpo monoclonal D25 al antígeno. La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciara que otros anticuerpos que específicamente se unen al sitio antigénico Ø de la proteína F de RSV (tal como el anticuerpo AM22 o el anticuerpo 5C4), u otros anticuerpos que son específicos de prefusión, pero que no se unen al sitio antigénico Ø (tal como MPE8) también se pueden utilizar para identificar un antígeno PreF que incluye una proteína F de RSV estabilizada en una conformación de prefusión.

De esta manera, los antígenos PreF descritos en la presente están unidos específicamente por un anticuerpo que es específico para la conformación de prefusión de F de RSV pero no la conformación de post-fusión. En varias realizaciones, el antígeno PreF se une específicamente por el anticuerpo D25 y/o AM22, que (como se describe en la presente) son anticuerpos específicos para la conformación de pre- pero no de post-fusión de la proteína F de RSV. En varios ejemplos, el anticuerpo específico de prefusión (tal como D25 o AM22) se une

específicamente al antígeno PreF con una constante de disociación menor que aproximadamente 10^{-6} molar, tal como menor que aproximadamente 10^{-7} molar, 10^{-8} molar o menor que 10^{-9} molar. La unión específica se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. La determinación de la unión específica fácilmente se puede hacer al utilizar o al adaptar los procedimientos de rutina, tal como ELISA, inmunocompetición, resonancia de plasmón de superficie u otros ensayos inmunosorbentes (descritos en muchos textos estándares, que incluyen Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual,* CSHL, Nueva York, 1999).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF no es unido específicamente por un anticuerpo que se une a la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. Por ejemplo, un anticuerpo específico para el haz de seis hélices encontrado únicamente en la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV (*p. ej.,* como se describe en Magro *et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.,* 109:3089-3094, 2012). En varios ejemplos, la constante de disociación para el anticuerpo específico de post-fusión de F de RSV que se une al antígeno PreF es mayor que 10^{-5} molar, tal como por lo menos 10^{-5} molar, 10^{-4} molar o 10^{-3}.

En varias realizaciones, cualquiera de los antígenos PreF incluye un epítopo de prefusión de proteína F de RSV (tal como un epítopo D25 o AM22) en una conformación unida a anticuerpo específico de prefusión de proteína F de RSV (tal como una conformación unida a D25 o AM22). Por ejemplo, en varias realizaciones, cualquiera de los antígenos PreF incluye un epítopo en una confirmación unida al epítopo D25 o AM22 (*p. ej.,* la conformación definida por las coordenadas estructurales proporcionadas en la Tabla 1) cuyo el antígeno PreF no es unido por D25 o AM22, es decir, el antígeno PreF se estabiliza en la conformación unida a D25 o AM22. Métodos para determinar si un antígeno PreF descrito incluye un epítopo de prefusión de proteína F de RSV (tal como un epítopo D25 o AM22) en una conformación unida a anticuerpo monoclonal específico de prefusión de proteína F de RSV (tal como una conformación unida a D25 o AM22) son conocidos para la persona de experiencia ordinaria en la técnica y, además, se describe en la presente (véase, por ejemplo McLellan *et al.*, Nature, 480:336-343, 2011; y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2010/0068217). Por ejemplo, la estructura tridimensional descrita del fragmento Fab de D25 en complejo con la proteína F de RSV se puede comparar con la estructura tridimensional de cualquiera de los antígenos PreF descritos.

La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciara que un antígeno PreF descrito puede incluir un epítopo en una conformación unida a anticuerpo monoclonal específico de prefusión, aunque las coordenadas estructurales del antígeno no son estrictamente idénticas a aquellas de la proteína F de prefusión como se describe en la presente. Por ejemplo, en varias realizaciones, cualquiera de los antígenos PreF descritos incluye un epítopo específico de prefusión de F de RSV (tal como un epítopo D25 o AM22) que en ausencia del anticuerpo monoclonal específico de prefusión de F de RSV se puede superponer estructuralmente sobre el epítopo correspondiente en complejo con el anticuerpo monoclonal específico de prefusión de F de RSV con una desviación cuadrática media (RMSD) de sus coordenadas menor que 1.0, 0.75, 0.5, 0.45, 0.4, 0.35, 0.3 o 0.25 Å/residuo, en donde la RMSD se mide sobre los átomos de la cadena principal del polipéptido N, Cα, C, O, para al menos tres aminoácidos consecutivos.

En varias realizaciones, el antígeno PreF es soluble en solución acuosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF es soluble en una solución que carece de detergente. En algunas realizaciones, el antígeno PreF se disuelve a una concentración de por lo menos 0.5 mg/ml (tal como por lo menos 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 3.0 mg/ml, 4.0 mg/ml o por lo menos 5.0 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7.4) a temperatura ambiente (p. ej., 20-22 grados Celsius) y permanece disuelto durante al menos aproximadamente 12 horas (tal como durante al menos 24 horas, durante al menos 48 horas, durante al menos una semana, durante al menos dos semanas o más tiempo). En una realización, la solución salina tamponada con fosfato incluye NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na_2HPO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (1.8 mM) a pH 7.4. En algunas realizaciones, la solución salina tamponada con fosfato incluye, además, $CaCl_2$ (1 mM) y $MgCl_2$ (0.5 mM). La persona de experiencia en la técnica está familiarizada con métodos para determinar si una proteína permanece en solución a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la concentración de proteína disuelta en una solución acuosa se puede testar a lo largo del tiempo utilizyo métodos estándares.

En varias realizaciones, cualquiera de los antígenos PreF descritos se pueden utilizar para inducir una respuesta inmune al RSV en un sujeto. En varias realizaciones de este tipo, la inducción de la respuesta inmune incluye la producción de anticuerpos neutralizantes a RSV. Métodos para ensayar la actividad de neutralización son conocidos para la persona de experiencia ordinaria en la técnica y, además, descritos en la presente, e incluyen, pero no están limitados a, ensayos de neutralización de reducción en placa (PRNT), ensayos de microneutralización (véase, *p. ej.,* Yerson et al., *J. Clin. Microbiol.,* 22:1050-1052, 1985), o ensayos basados en citometría de flujo (véase, *p. ej.,* Chen *et al., J. Immunol. Methods.,* 362:180-184, 2010). Ensayos de neutralización adicionales se describen en la presente y son familiares para la persona de experiencia ordinaria en la técnica.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que, cuyo se disuelve en una solución acuosa, forma una población de proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato en pH fisiológico, tal como pH 7.4. En algunas realizaciones, la población es una población homogénea que

incluye una o más proteínas F de RSV recombinantes que son, por ejemplo, todas estabilizadas en una conformación de prefusión. En algunas realizaciones, por lo menos aproximadamente 90 % de las proteínas F de RSV recombinantes (tal como por lo menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99.9 % de las proteínas F de RSV) en la población homogénea se estabilizan en la conformación de prefusión. En algunas realizaciones, por lo menos aproximadamente 90 % de las proteínas F de RSV recombinantes (tal como por lo menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99.9 % de las proteínas F de RSV) en la población homogénea se unen específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluyen en una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como sitio antigénico Ø). Se entenderá que una población homogénea de proteínas F de RSV en una conformación particular puede incluir variaciones (tales como variaciones de modificación de proteínas, p. ej., estado de glicosilación), que no alteran el estado conformacional de la proteína F de RSV. En varias realizaciones, la población de proteínas F de RSV recombinante permanece homogénea a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que, cuyo se disuelve en solución acuosa, forma una población de proteínas F de RSV recombinantes que se estabiliza en una conformación de prefusión durante por lo menos 12 horas, tal como por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas, por lo menos una semana, por lo menos dos semanas o más.

En varias realizaciones, los antígenos PreF aislados se separan sustancialmente de las proteínas F de RSV en una conformación de post-fusión. De esta manera, el antígeno PreF puede ser, por ejemplo, por lo menos 80 % aislado, por lo menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9% separado de las proteínas F de RSV en una conformación de post-fusión. En varias realizaciones, los antígenos PreF también se separan de las proteínas F de RSV que no incluyen el sitio antigénico Ø y/o no están unidas específicamente por un anticuerpo monoclonal específico de prefusión (tal como D25 o AM22). Por ejemplo, el antígeno PreF puede ser por lo menos 80 % aislado, por lo menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9% separado de las proteínas F de RSV que no incluyen el sitio antigénico Ø y/o no están unidos específicamente por un anticuerpo monoclonal específico de prefusión (tal como D25 o AM22).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que, cuyo se incuba en una solución acuosa, forma una población de proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión, en donde por lo menos 70 % (tal como por lo menos 80 %, o por lo menos 90 % o por lo menos 95 % o por lo menos 98 %) de los antígenos aislados en la población se unen específicamente a un anticuerpo específico de prefusión de proteína F de RSV (tal como D25 o AM22) después de

(a) incubación durante una hora en NaCl 350 mM pH 7.0, a 50 °C;

(b) incubación durante una hora en NaCl 350 mM pH 3.5, a 25 °C;

(c) incubación durante una hora en NaCl 350 mM pH 10, a 25 °C;

(d) incubación durante una hora en la osmolaridad 10 mM, pH 7.0, a 25 °C;

(e) incubación durante una hora en la osmolaridad 3000 mM, pH 7.0, a 25 °C;

(g) una combinación de dos o más de (a)-(e); o

una combinación de (a) y (b); (a) y (c); (a) y (d); (a) y (e); (b) y (d); (b) y (e); (c) y (d); (c) y (e); (a), (b) y (d); (a), (c) y (d); (a), (b) y (e); o (a), (c) y (e).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que, cuyo se incuba en una solución acuosa, forma una población de proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión, en donde por lo menos 60 % (tal como por lo menos 70 %, por lo menos 80 % o por lo menos 90 %) de los antígenos aislados en la población se unen específicamente al anticuerpo específico de prefusión después de diez ciclos de congelación-descongelación en NaCl 350 mM pH 7.0.

En algunas realizaciones, los antígenos PreF se proporcionan como una población homogénea que no incluye proteína F de RSV detectable en una conformación de post-fusión. La proteína F de RSV es detectable por el microscopio electrónico de tinción negativa y/o la unión específica mediante un anticuerpo de post-fusión.

1. Proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión

Los antígenos PreF descritos en la presente incluyen una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L (en comparación con una proteína F de RSV nativa como se recoge como una de SEQ ID NOs:1-184) e incluyen un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2. El polipéptido F_1, el polipéptido F_2, o ambos, pueden incluir por lo menos una modificación adicional (*p. ej.,* una sustitución de aminoácido) que estabiliza adicionalmente la proteína F de RSV recombinante en su conformación de prefusión. En varias realizaciones, el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 se

enlazan por un enlazador peptídico (por ejemplo, en realizaciones que incluyen una proteína F de RSV de cadena sencilla). La estabilización de la proteína F de RSV recombinante en la conformación de prefusión preserva por lo menos un epítopo específico de prefusión (*es decir,* un epítopo presente en la conformación de pre- (pero no post-) fusión de la proteína F de RSV) que se une específicamente a un anticuerpo monoclonal específico de prefusión de F de RSV (*es decir,* un anticuerpo que específicamente se une a la proteína F de RSV en una conformación de prefusión, pero no en una conformación de post-fusión). De esta manera, los antígenos PreF descritos están unidos específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunos ejemplos, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y/o F_2 a partir de un virus de RSV A, por ejemplo, un polipéptido F_1 y/o F_2 de una proteína F_0 de RSV proporcionada como una de SEQ ID NOs: 1-128, o 370, que se modifica para incluir sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L que estabilizan la proteína F de RSV recombinante en una conformación de prefusión. En algunos ejemplos, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y/o F_2 de un virus RSV B, por ejemplo, un polipéptido F_1 y/o F_2 de una proteína F_0 de RSV proporcionada como una de SEQ ID NOs: 129-177, que se modifica para estabilizar la proteína F de RSV recombinante en una conformación de prefusión. En algunos ejemplos, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y/o F_2 de un virus de RSV bovino, por ejemplo, un polipéptido F_1 y/o F_2 de una proteína F_0 de RSV proporcionada como una de SEQ ID NOs: 178-184, que se modifica a sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L que estabilizan la proteína F de RSV recombinante en una conformación de prefusión. También se pueden utilizar los polipéptidos F_1 y/o F_2 de los otros subtipos de RSV. La proteína F de RSV recombinante puede incluir, además, modificaciones de las secuencias de RSV nativas, tales como sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, glicosilación y/o enlace covalente a proteínas no relacionadas (p. ej., una etiqueta de proteína), siempre que el antígeno PreF conserve la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L. Las proteínas F de RSV de los diferentes subgrupos de RSV, así como las secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de este tipo y métodos para la manipulación e inserción de secuencias de ácido nucleico de este tipo en vectores, se describen en la presente y son conocidas en la técnica (véase, *p. ej.,* Tan *et al.,* PLOS one, 7: e51439, 2011; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y. (1994)).

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que comprende secuencias de aminoácidos por lo menos 80 % idénticas a los aminoácidos 26-103 y 145-310, respectivamente, de una secuencia de proteína F de RSV nativa recogida como una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184, tal como SEQ ID NO: 124.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que comprende las secuencias de aminoácidos por lo menos 80 % (tal como por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 %) idénticas a los aminoácidos 26-103 y 145-513, respectivamente, de una secuencia de proteína F de RSV nativa recogida como una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184, tal como SEQ ID NO: 124.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que comprende las secuencias de aminoácidos por lo menos 80 % (tal como por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 %) idénticas a los aminoácidos 26-103 y 145-529, respectivamente, de una secuencia de proteína F de RSV nativa recogida como una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184, tal como SEQ ID NO: 124.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que comprende las secuencias de aminoácidos por lo menos 80 % (tal como por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o incluso 100 %) idénticas a los aminoácidos 26-103 y 145-551, respectivamente, de una secuencia de proteína F de RSV nativa recogida como una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184, tal como SEQ ID NO: 124.

En algunos ejemplos, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y/o F_2 que incluyendo secuencias polipeptídicas que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con un polipéptido F_1 y/o F_2 de RSV de un virus RSV A, por ejemplo, un polipéptido F_1 y/o F_2 de una proteína F_0 de RSV proporcionada como una de SEQ ID NOs: 1-128 o 370. En ejemplos adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y/o F_2 que incluye secuencias de polipéptido que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con un polipéptido F_1 y/o F_2 de RSV de un virus RSV B, por ejemplo, un polipéptido F_1 y/o F_2 de una proteína F_0 proporcionada como una de SEQ ID NOs: 129-177. En ejemplos adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye el polipéptido F_1 y/o F_2 que incluye secuencias de polipéptido que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad

de secuencia con un polipéptido F_1 y/o F_2 de RSV de un virus RSV bovino, por ejemplo, un polipéptido F_1 y/o F_2 de una proteína F_0 de RSV proporcionada como una de SEQ ID NOs: 178-184.

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 que incluye o que consiste en por lo menos 300 aminoácidos consecutivos (tales como por lo menos 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420 o 430 aminoácidos consecutivos) de una secuencia de polipéptido F_1 nativa, tal como las posiciones 137-513 de una de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, que incluye cualesquiera de las secuencias de polipéptido que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptido F_1 nativa, tal como las posiciones 137-513 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F recombinante que incluye un polipéptido F_1 que incluye o que consiste en las posiciones 137-513, 137-481, 137-491, o la posición 137 con respecto al extremo C, o las posiciones 137-al dominio de transmembrana, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, que incluye cualquiera de las secuencias de polipéptido que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptido F_1 nativa, tal como las posiciones 137-513, o la posición 137 con respecto al extremo C, o las posiciones 137-al dominio de transmembrana, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370. La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciara que el antígeno PreF que incluye la proteína F de RSV recombinante puede incluir un polipéptido F_1 con truncamientos N- o C-terminales (por ejemplo, deleción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 o más aminoácidos) en comparación con la región extracelular de un polipéptido F_1 nativo (por ejemplo, las posiciones 137-524), siempre que el antígeno PreF se una específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye una longitud máxima, por ejemplo no más de 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430 o no más de 440 aminoácidos de longitud. El polipéptido F_1 puede incluir, consistir o consistir esencialmente en las secuencias descritas. Las secuencias de polipéptido F_1 contiguas descritas también se pueden unir en cualquier extremo a otras secuencias no relacionadas (por ejemplo, las secuencias no de proteína F_1 de RSV, las secuencias no de proteína F de RSV, las secuencias no RSV, de envoltura no viral o de proteína no viral).

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_2 que incluye o que consiste en por lo menos 60 aminoácidos consecutivos (tal como por lo menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 o 109 aminoácidos consecutivos) de una secuencia de polipéptido F_2 nativa, tal como las posiciones 26-109 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, que incluye secuencias polipeptídicas que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptido F_1 nativa, tal como las posiciones 26-109 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F recombinante que incluye un polipéptido F_2 que incluye o que consiste en 70-109 aminoácidos consecutivos (tal como 60-100, 75-95, 80-90, 75-85, 80-95, 81-89, 82-88, 83-87, 83-84 u 84-85 aminoácidos consecutivos) de una secuencia polipeptídica F_2 nativa, tal como las posiciones 26-109 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, incluyendo cualquiera de las secuencias polipeptídicas que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptido F_2 nativa, tal como las posiciones 137-513 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_2 también de una longitud máxima, por ejemplo no más de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud. El polipéptido F_2 puede incluir, consistir o consistir esencialmente en las secuencias descritas. Las secuencias polipeptídicas F_2 contiguas descritas también pueden estar unidas en cualquier extremo a otras secuencias no relacionadas (por ejemplo, secuencias no de proteína F_2 de RSV, las secuencias no de proteína F de RSV, las secuencias no RSV, no RSV, de envoltura no viral o de proteína no viral).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_2 que incluye o que consiste en por lo menos 60 aminoácidos consecutivos (tal como por lo menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 , 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 o 109 aminoácidos consecutivos) de una secuencia polipeptídica F_2 nativa tal como las posiciones 26-109 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, que incluye las secuencias polipeptídicas que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica F_2 nativa, tales como los aminoácidos 26-109 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye un polipéptido F_1 que incluye o que consiste en por lo menos 300 aminoácidos consecutivos (tal como por lo menos 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420 o 430 aminoácidos consecutivos)

de una secuencia polipeptídica F_1 nativa, tal como las posiciones 137-513 de una de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, que incluye cualquiera de las secuencias polipeptídicas que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica F_1 nativa, tal como las posiciones 137-513 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370.

En un ejemplo no limitante, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, que incluye las secuencias polipeptídicas que tienen por lo menos 75 % (por ejemplo, por lo menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con respecto a las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370.

Como se mencionó anteriormente, la proteína F de RSV se sintetiza inicialmente como una proteína precursora F_0 y se escinde en múltiples sitios (incluyendo dos sitios de escisión de furina conservados) durante la maduración en células eucarióticas. Por lo tanto, la proteína F de RSV nativa carece del péptido señal N-terminal y el péptido pep27 (o una porción del mismo) de la proteína precursora F_0. En varias realizaciones, las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en la conformación de prefusión no incluyen el péptido señal (o una porción del mismo) y/o no incluyen el péptido pep27 (o una porción del mismo). La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciara que las proteínas F de RSV recombinantes que carecen del péptido señal F de RSV y/o el péptido pep27 se puede generar al expresar el polipéptido F_0 recombinante en células en las que el péptido señal y el péptido pep27 serán escindidos del precursor F_0 por proteasas celulares.

Varias realizaciones incluyen un antígeno PreF que incluye un multímero de cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas, por ejemplo, un multímero que incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más de las proteínas F de RSV recombinantes descritas. En varios ejemplos, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas se pueden enlazar (*p. ej.,* a través de un enlazador peptídico) a otra de las proteínas F de RSV recombinantes para formar el multímero.

Se entiende en la técnica que se pueden hacer algunas variaciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína sin afectar la actividad de la proteína. Variaciones de este tipo incluyen la inserción de residuos de aminoácido, deleciones de residuos de aminoácido y sustituciones de residuos de aminoácido. Estas variaciones en la secuencia pueden ser variaciones que se producen de forma natural o se pueden modificar por ingeniería genética a través del uso de la técnica de ingeniería genética conocida para los expertos en la técnica. Ejemplos de técnicas de este tipo se encuentran en Sambrook J, Fritsch E F, *Maniatis* T *et al.,* en Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp 9.31-9.57), o en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1, un polipéptido F_2, o tanto un polipéptido F_1 como F_2 que incluyen una o más sustituciones de aminoácido en comparación con la secuencia de RSV nativa correspondiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido F_1, el polipéptido F_2 o tanto el polipéptido F_1 como el polipéptido F_2, incluyen hasta 20 (tal como hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) sustituciones de aminoácido en comparación con una secuencia polipeptídica F_1 nativa, tal como una secuencia de RSV nativa recogida como una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión de F de RSV (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En realizaciones adicionales, el polipéptido F_1, el polipéptido F_2 o tanto el polipéptido F_1 como el polipéptido F_2 incluyen hasta 20 (tal como hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) sustituciones de aminoácido conservativas en comparación con una secuencia polipeptídica F_1 nativa, tal como una secuencia de RSV nativa recogida como una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión de F de RSV (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante en una conformación de prefusión que se modifica para incrementar la expresión de la proteína para fines de producción de proteínas, *p. ej.,* mediante la eliminación de una o más señales de localización nucleares presentes en la proteína F de RSV. La manipulación de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia polipeptídica F_1 o F_2 (tal como una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido F_0 que incluye los polipéptidos F_1 y F_2) utilizyo procedimientos estándares, incluyendo en una realización no limitante, específica, mutagénesis dirigida al sitio o en otro realización no limitante específica, PCR, se puede utilizar para producir variantes de este tipo. Alternativamente, los polipéptidos F_1 y F_2 se pueden sintetizar utilizyo métodos estándares. Las modificaciones más simples implican la sustitución de uno o más aminoácidos con aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares. Estas sustituciones llamadas conservativas son probables que tengan un impacto mínimo en la actividad de la proteína resultante.

a. Modificaciones estabilizantes distales a la membrana

Como se describe en la presente, la proteína F de RSV se somete a un reordenamiento estructural entre sus conformaciones de pre- y post-fusión. Como se muestra en la FIG. 2B, la región N-terminal del polipéptido F_1 en

la conformación de prefusión (correspondiente en parte al lóbulo distal a la membrana mostrado en la FIG. 2A) incluye las estructuras helicoidales α2, α3, β3, β4 y α4 y de lámina beta indicadas, mientras que la región correspondiente del extremo N del polipéptido F_1 en la estructura de post-fusión incluye una estructura helicoidal α5 extendida - las estructuras helicoidales α2, α3, β3, β4 y α4 y de lámina beta están ausentes. Además, la región C-terminal del polipéptido F_1 en la conformación de prefusión (correspondiente en parte al lóbulo proximal a la membrana mostrado en la FIG. 2A) incluye las estructuras β22, α9 y de lámina beta β23 y helicoidales indicadas, mientras que la región C-terminal correspondiente del polipéptido F_1 en la estructura de conformación de post-fusión incluye una estructura helicoidal α10 extendida y las estructuras β22, α9 y de lámina beta β23 y helicoidales están ausentes. Por lo tanto, los lóbulos distal a la membrana y proximal a la membrana de la proteína F de RSV en su conformación de prefusión incluyen varios elementos estructurales distintos que están ausentes de las regiones correspondientes de la proteína F de RSV en su conformación de post-fusión.

Guiado por las características estructurales identificadas en las conformaciones de pre- y post-fusión de la proteína F de RSV, están disponibles varios modos para estabilizar la proteína F de RSV en una conformación de prefusión, incluyendo las sustituciones de aminoácido que introducen uno o más enlaces disulfuro no naturales, rellenan las cavidades dentro de la proteína F de RSV, alteran el empaquetamiento de residuos en la proteína F de RSV, introducen sitios de glicosilación N-enlazados, y combinaciones de los mismos. Las modificaciones estabilizantes proporcionadas en la presente son modificaciones fijadas como objetivo que estabilizan la proteína F de RSV recombinante en la conformación de prefusión. En varias realizaciones, la proteína F de RSV no se estabiliza por la reticulación no específica, tal como la reticulación de glutaraldehído, por ejemplo la reticulación de glutaraldehído de los trímeros F de RSV unidos a membrana.

En algunas realizaciones no limitantes, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante la introducción de un enlace disulfuro, en donde la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones S155C y S290C; G151C y I288C; A153C y K461C; A149C e Y458C; G143C y S404S; o las sustituciones de aminoácido Y33C y V469C. Ejemplos no limitantes de proteínas precursoras de proteínas F de RSV recombinantes de este tipo (incluyendo un dominio Foldon enlazado al extremo C del polipéptido F1) se recogen en la presente como SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 209 y SEQ ID NO: 211. En realizaciones no limitantes adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante la introducción de un enlace disulfuro y una o más sustituciones de relleno de las cavidades, en donde la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones S155C, S290C, y un residuo hidrófobo grye en la posición 190, y/o la posición 207 (p. ej., una sustitución S190F, S190W o S190L, y/o una sustitución V207L, V207F o V207W). Ejemplos no limitantes de proteínas precursoras de proteínas precursoras F de RSV recombinantes de este tipo (incluyendo un dominio foldon enlazado al extremo C del polipéptido F1) se recogen en la presente como SEQ ID NO: 371, SEQ ID NO: 372, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374, SEQ ID NO: 375 y SEQ ID NO: 376.

Muchas de las secuencias de las proteínas F de RSV recombinantes descritas en la presente incluyen la secuencia de sitios de escisión de proteasa (tales como sitios de trombina), etiquetas de proteínas (tal como una etiqueta His, una Strep Tag II, una etiqueta Avi, etc., que no son esenciales para la función de la proteína F de RSV, tal como para la inducción de una respuesta inmune en un sujeto. La persona de experiencia ordinaria en la técnica reconocerá secuencias de este tipo, y cuyo es apropiado, entenderá que estas etiquetas o sitios de escisión de proteasa no se incluyen en una proteína F de RSV recombinante descrita.

i. Enlaces Disulfuro no Naturales

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión por al menos un enlace disulfuro no natural que incluye un par de residuos cisteína reticulados. Un enlace disulfuro no natural es uno que no se produce en una proteína F de RSV nativa, y se introduce mediante ingeniería de proteínas (p. ej., al incluir uno o más residuos cisteína sustituidos que forman el enlace disulfuro no natural). Por ejemplo, en algunas realizaciones, cualquiera de la proteína F de RSV recombinante descrita se estabiliza en una conformación de prefusión por cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 enlaces disulfuro que incluyen un par de residuos cisteína reticulados. En un ejemplo no limitante específico, la proteína F de RSV recombinante se estabiliza en una conformación de prefusión mediante un solo par de residuos cisteína reticulados. En otro ejemplo no limitante, cualquiera de la proteína F de RSV recombinante descrita se estabiliza en una conformación de prefusión mediante dos pares de residuos cisteína reticulados.

Los residuos cisteína que forman el enlace disulfuro se pueden introducir en la secuencia de proteína F de RSV nativa por una o más sustituciones de aminoácido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una sola sustitución de aminoácido introduce una cisteína que forma un enlace disulfuro con un residuo cisteína presente en la secuencia de la proteína F de RSV nativa. En realizaciones adicionales, dos residuos cisteína se introducen en una secuencia de RSV nativa para formar el enlace disulfuro. La ubicación de la cisteína (o cisteínas) de un enlace disulfuro para estabilizar la proteína F de RSV en una conformación de prefusión se puede determinar fácilmente por la persona de experiencia ordinaria en la técnica utilizyo la estructura descrita de la proteína F de

RSV en su conformación de prefusión, y la estructura previamente identificada de la proteína F de RSV en su conformación de post-fusión.

Por ejemplo, las posiciones de aminoácido de las cisteínas están típicamente dentro de una distancia suficientemente cercana para la formación de un enlace disulfuro en la conformación de prefusión de la proteína F de RSV. Métodos para utilizar datos de estructura tridimensional para determinar si dos residuos están dentro de una distancia suficientemente cercana entre sí para la formación de un enlace disulfuro son conocidos (véase, p. ej., Peterson et al., *Protein engineering,* 12:535-548, 1999 y Dombkowski, *Bioinformatics,* 19:1852-1853, 3002 (que describe DISULFIDE BY DESIGN™). Por ejemplo, los residuos se pueden seleccionar manualmente en base a la estructura tridimensional de la proteína F de RSV en una conformación de prefusión proporcionada en la presente, o se puede utilizar un software tal como DISULFIDE BY DESIGN™. Sin estar ligados por la teoría, se considera generalmente que las distancias ideales para la formación de un enlace disulfuro son aproximadamente ~5.6 Å para la distancia de Cα-Cα, ~2.02 Å para la distancia de Sγ-Sγ y 3.5-4.25 Å para la distancia de Cβ-Cβ (utilizyo el rotómero óptimo). La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que se incluyen variaciones de estas distancias cuyo se seleccionan residuos en una estructura tridimensional que se pueden sustituir por cisteínas para la introducción de un enlace disulfuro. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los residuos seleccionados tienen una distancia de Cα-Cα menor que 7.0 Å y/o una distancia de Cβ-Cβ menor que 4.7 Å. En algunas realizaciones, los residuos seleccionados tienen una distancia de Cα-Cα de 2.0-8.0 Å y/o una distancia de Cβ-Cβ de 2.0-5.5 Å. En varias realizaciones, las posiciones de aminoácidos de las cisteínas están dentro de una distancia suficientemente cercana para la formación de un enlace disulfuro en la conformación de prefusión, pero no de post-fusión de la proteína F de RSV.

La persona de experiencia ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente la posición relativa de un aminoácido particular entre las conformaciones de pre- y post-fusión de la proteína F de RSV, por ejemplo al comparar las estructuras de prefusión definidas en la presente por las coordenadas estructurales proporcionadas en la Tabla 1, con la estructura de post-fusión previamente identificada descrita en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011, con coordenadas estructurales depositadas como Acceso de PDB Nº 3RRR). Se conocen métodos para determinar la posición relativa de un aminoácido particular entre las dos estructuras de proteína (p. ej., entre las estructuras tridimensionales de la proteína F de RSV de pre- y post-fusión). Por ejemplo la persona de experiencia ordinaria en la técnica puede utilizar métodos de superposición conocidos para comparar las dos estructuras (p. ej., métodos utilizyo el programa LSQKAB (Kabsch W. *Acta. Cryst.* **A32** 922-923 (1976)). En un ejemplo, la estructuras de pre- y post-fusión se pueden superponer al utilizar LSQKAB para alinear las posiciones de proteína F 26-60, 77-97, 220-322 y 332-459 definidas por las coordenadas estructurales proporcionadas en la Tabla 1, con las posiciones de proteína F 26-60, 77-97, 220-322 y 332-459 definidos por las coordenadas estructurales depositadas como Acceso de PDB Nº 3RRR y al comparar la distancia entre el átomo Cα para cada uno de los residuos en las estructuras de pre- y post-fusión para identificar la desviación de los residuos particulares entre las dos estructuras.

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante un enlace disulfuro entre una cisteína introducida en una posición de aminoácido que cambia la conformación, y una cisteína introducida en una posición de aminoácido que no cambia la conformación, entre las estructuras de pre- y post-fusión, respectivamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye sustituciones de aminoácidos que introducen un par de cisteínas, en donde la primer cisteína está en una posición de aminoácido de la proteína F de RSV que tiene una desviación cuadrática media de por lo menos 5 (tal como por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10) angstroms entre la estructura tridimensional de la proteína F de RSV de las conformaciones de pre- y post-fusión, y la segunda cisteína está en una posición de aminoácido de la proteína F de RSV que tiene una desviación cuadrática media menor que 4 (tal como menor que 3, 2 o 1) angstroms entre la estructura tridimensional de las conformaciones de pre- y post-fusión de la proteína F de RSV, en donde el antígeno PreF se une específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* el anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En base a una comparación de las estructuras F de RSV de pre- y post-fusión, existen por lo menos dos regiones que se someten a cambios conformacionales gryes, ubicadas en los extremos N y C de la subunidad F_1 (residuos 137-216 y 461-513, respectivamente). Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 2B, las posiciones 137-216 y 461-513 del polipéptido F_1 se someten al reordenamiento estructural entre las conformaciones Pre- y Post-de proteína F, mientras que las posiciones 217-460 del polipéptido F_1 permanecen relativamente sin cambio. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión por un enlace disulfuro entre una primera cisteína en una de las posiciones 137-216 o 461-513 del polipéptido F_1, y una segunda cisteína en una de las posiciones 217-460 del polipéptido F_1. En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión por un enlace disulfuro entre una primera cisteína en una de las posiciones 137-216 o 461-513 del polipéptido F_1, y una segunda cisteína en una posición del polipéptido F_2, tal como una de las posiciones 26-109 (por ejemplo, una de las posiciones 26-61 o 77-97) del polipéptido F_2.

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante un enlace disulfuro entre cisteínas que se introducen en las posiciones de aminoácido que cambian la conformación entre las estructuras de pre- y post-fusión, respectivamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye sustituciones de aminoácido que introducen un par de cisteínas, en donde la primera cisteína y la segunda cisteína están en una posición de aminoácidos de la proteína F de RSV que tiene una desviación cuadrática media de por lo menos 5 (tal como por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10) angstroms entre la estructura tridimensional de la proteína F de RSV de las conformaciones de pre- y post-fusión, en donde el antígeno PreF incluye actividad de unión específica a un anticuerpo específico de prefusión de F de RSV (*p. ej.,* el anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye un epítopo específico de prefusión de F de RSV (*p. ej.,* un epítopo D25 o AM22). En algunas realizaciones de este tipo, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante un enlace disulfuro entre una primera cisteína y la segunda cisteína en las posiciones 137-216 del polipéptido F_1. En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión por un enlace disulfuro entre la primera cisteína y la segunda cisteína en las posiciones 461-513 del polipéptido F_1. En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante un enlace disulfuro entre la primera cisteína y la segunda cisteína en las posiciones 137-216 y 461-513, respectivamente, del polipéptido F_1.

La persona con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente la ubicación de un aminoácido particular en las conformaciones de pre- y post-fusión de la proteína F de RSV (y cualquier diferencia en una posición entre las dos conformaciones) utilizyo las coordenadas estructurales de la estructura tridimensional de la proteína F de RSV en la conformación de prefusión (que se recogen en la Tabla 1) y las coordenadas estructurales de la estructura tridimensional de la proteína F de RSV en la conformación de post-fusión (que se recogen en el Acceso del Banco de Datos de Proteínas Nº 3RRR). Por ejemplo, métodos de comparación de este tipo se describen en el Ejemplo 1. La Tabla 5 proporciona ejemplos de pares de cisteína y sustituciones de aminoácido que se pueden utilizar para estabilizar una proteína F de RSV en una conformación de prefusión.

Tabla 5. Pares de Cisteína Ejemplares para la Estabilización del Enlace Disulfuro

	Par(es) de Residuos de Proteína F para Sustitución de Cisteína	Sustituciones correspondientes a SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO
Sustituciones de F_1 - Enlace Disulfuro Intra-Protómero			
1	155 y 290	S155C y S290C	185
2	151 y 288	G151C y I288C	189
3	137 y 337	F137C y T337C	213
4	397 y 487	T397C y E487C	247
5	138 y 353	L138C y P353C	257
6	341 y 352	W341C y F352C	267
7	403 y 420	S403C y T420C	268
8	319 y 413	S319C y I413C	269
9	401 y 417	D401C y Y417C	270
10	381 y 388	L381C y N388C	271
11	320 y 415	P320C y S415C	272
12	319 y 415	S319C y S415C	273
13	331 y 401	N331C y D401C	274
14	320 y 335	P320C y T335C	275
15	406 y 413	V406C y I413C	277
16	381 y 391	L381C y Y391C	278
17	357 y 371	T357C y N371C	279
18	403 y 417	S403C y Y417C	280
19	321 y 334	L321C y L334C	281
20	338 y 394	D338C y K394C	282
21	288 y 300	I288C y V300C	284
Sustituciones de F_2 y F_1 - Enlace Disulfuro Intra-Protómero			
22	60 y 194	E60C y D194C	190
23	33 y 469	Y33C y V469C	211
24	54 y 154	T54C y V154C	212
25	59 y 192	I59C y V192C	246
26	46 y 311	S46C y T311C	276

27	48 y 308	L48C y V308C	283
28	30 y 410	E30C y L410C	285
Sustituciones de F_1 - Enlace Disulfuro Inter-Protómero			
29	400 y 489	T400C y D489C	201
30	144 y 406	V144C y V406C	202
31	153 y 461	A153C y K461C	205
32	149 y 458	A149C y Y458C	207
33	143 y 404	G143C y S404S	209
34	346 y 454	S346C y N454C	244
35	399 y 494	K399C y Q494C	245
36	146 y 407	S146C y I407C	264
37	374 y 454	T374C y N454C	265
38	369 y 455	T369C y T455C	266
39	402 y 141	V402C y L141C	302
Sustituciones de F_2 y F_1 - Enlace Disulfuro Inter-Protómero			
40	74 y 218	A74C y E218C	243
Inserciones de aminoácidos para orientar el Enlace Disulfuro			
41	145 y 460 (Inter), inserción de AA entre las posiciones 146 y 147	S145C y 460C; inserción de AA entre las posiciones 146/147	338
42	183 y 423 (Inter); inserción de AAA entre las posiciones 182 y 183	N183C y K423C; inserción de AAA entre las posiciones 182/183	339
43	330 y 430 (Inter); inserción de CAA entre las posiciones 329 y 330	A329C y S430C; inserción de CAA entre las posiciones 329 y 330	340
Combinaciones			
44	155 y 290 (Intra); y 402 y 141 (Inter)	S155C y S290C; y V402C y L141C	303
45	155 y 290(Intra); y 74 y 218	S155C y S290C; y A74C y E218C	263
46	155 y 290 (Intra); y 146 y 460 (Inter); inserción de G entre las posiciones 460 y 461	S155C y S290C; y S146C y N460C; inserción de G entre las posiciones 460 y 461	258
47	155 y 290 (Intra); y 345 y 454(Inter); inserción de C entre las posiciones 453 y 454	S155C y S290C; y N345C y N454G; inserción de C entre las posiciones 453 y 454	259
48	155 y 290 (Intra); y 374 y 454(Inter); inserción de C entre las posiciones 453 y 454	S155C y S290C; y T374C y N454G; inserción de C entre las posiciones 453 y 454'	260
49	155 y 290 (Intra); y 239 y 279(Inter); inserción de C entre las posiciones 238 y 239	S155C y S290C; y S238G y Q279C; inserción de C entre las posiciones 238 y 239	261
50	155 y 290 (Intra); y 493 emparejado con la inserción de C entre las posiciones 329 y 330	S155C y S290C; y S493C emparejado con la inserción de C entre las posiciones 329 y 330	262
51	183 y 428 (Inter), inserción de G entre las posiciones 182 y 183	N183C y N428C; inserción de G entre las posiciones 182 y 183	296
52	183 y 428 (Inter), inserción de C entre las posiciones 427 y 428	N183C y N427G; inserción de C entre las posiciones 427 y 428	297
53	155 y 290 (Intra); y 183 y 428(Inter); inserción de G entre las posiciones 182 y 183	S155C y S290C; y N183C y N428C; inserción de G entre las posiciones 182 y 183	298
54	155 y 290 (Intra); y 183 y 428(Inter); inserción de C entre las posiciones 427 y 428	S155C y S290C; y N183C y N427G; inserción de C entre las posiciones 427 y 428	299

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) enlaces disulfuro, incluyendo un enlace disulfuro entre residuos cisteína ubicados en las posiciones F de RSV enumeradas en una o más de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 2 de la Tabla 5, en donde el antígeno PreF se une específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) enlaces disulfuro, incluyendo enlaces disulfuro entre residuos cisteína

que se introducen por las sustituciones de aminoácidos de cisteína enumeradas en una o más de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 3 de la Tabla 5, en donde el antígeno PreF se une específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Las SEQ ID NOs enumeradas en la columna 4 de la Tabla 5 recogen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, así como, un péptido señal, el polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Por lo tanto, en realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en la columna 4 de la Tabla 5, tal como una SEQ ID NO enumerada en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 4 de la Tabla 5, en donde el antígeno PreF se une específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2, en donde los polipéptidos F_2 y F_1 incluyen la secuencia de aminoácidos recogida como posiciones 26-109 y137-513, respectivamente, en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en la columna 4 de la Tabla 5, tal como una SEQ ID NO enumerada en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 4 de la Tabla 5, en donde el antígeno PreF se une específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) enlaces disulfuro intra-protómero, que incluye enlace disulfuro entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones F de RSV del polipéptido F_1 enumeradas en una o más de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 de la columna 2 de la Tabla 5. Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) enlaces disulfuro de intra-protómero, que incluye enlaces disulfuro entre residuos cisteína que se introducen por las sustituciones de aminoácidos del polipéptido F_1 enumeradas en una o más de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 de la columna 3 de la Tabla 5. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno PreF se une específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o 7) enlaces disulfuro de intra-protómero, que incluye el enlace disulfuro entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones F de RSV de los polipéptidos F_2 y F_1 enumeradas en una o más de las filas 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de la columna 2 de la Tabla 5. Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o 7) enlaces disulfuro de intra-protómero, que incluye el enlace disulfuro entre los residuos cisteína que se introducen por las sustituciones de aminoácidos del polipéptido F_2 y F_1 enumeradas en una o más de las filas 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de la columna 3 de la Tabla 5. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) enlaces disulfuro de inter-protómero, que incluye el enlace disulfuro entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones F de RSV del polipéptido F_1 enumeradas en una o más de las filas 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39 de la columna 2 de la Tabla 5. Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye uno o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) enlaces disulfuro de inter-protómero, que incluyen el enlace disulfuro entre los residuos cisteína que se introducen por las sustituciones de aminoácidos del polipéptido F_1 enumeradas en una o más de las filas 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39 de la columna 3 de la Tabla 5. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro de inter-protómero entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones F de RSV de los polipéptidos F_2 y F_1 enumeradas en la columna 2 de la fila 40 de la Tabla 5. En realizaciones adicionales, el

antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro de inter-protómero entre los residuos cisteína que se introducen por las sustituciones de aminoácido en el polipéptido F_2 y F_1 enumeradas en la columna 3 de la fila 40 de la Tabla 5. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, los aminoácidos se pueden insertar (o suprimir) de la secuencia de proteína F para ajustar el alineamiento de los residuos en la estructura de proteína F, tal que pares de residuos particulares están dentro de una distancia suficientemente cercana para formar un enlace disulfuro de intra- o inter-protómero en la conformación de prefusión, pero no en la conformación de post-fusión. En varias realizaciones de este tipo, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones F de RSV del polipéptido F_1, así como la inserción de aminoácido enumerada en una o más de las filas 41, 42 o 43 de la columna 2 de la Tabla 5. En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro entre los residuos cisteína que se introducen por las sustituciones de aminoácidos del polipéptido F_1, así como la inserción de aminoácido, enumerada en una o más de las filas 41, 42 o 43 de la columna 3 de la Tabla 5.

En un ejemplo, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión que incluye un enlace disulfuro entre cisteínas en las posiciones 155 y 290 de F_1, tal como una proteína de polipéptido F_1 recombinante con las sustituciones S155C y S290C.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye una combinación de dos o más de los enlaces disulfuro entre residuos cisteína enumerados en la Tabla 5 o en la Tabla 5b, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Se entiende que algunas combinaciones no darán como resultado una proteína F de RSV estabilizada en una conformación de prefusión; combinaciones de este tipo se pueden identificar por métodos descritos en la presente, por ejemplo al confirmar que el antígeno que contiene un polipéptido de este tipo está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro no natural que estabiliza la proteína F en una conformación de prefusión, en donde la proteína F incluye las sustituciones enumeradas en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la columna 3 de la Tabla 5b, en donde residuos cisteína están insertados en la proteína F para la formación del enlace disulfuro no natural. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Las SEQ ID NOs enumeradas en la columna 4 de la Tabla 5b recogen las secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, así como un péptido señal, el polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV, que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recogen en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en la columna 4 de la Tabla 5b, tal como una SEQ ID NO enumerada en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la columna 4 de la Tabla 5b, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2, en donde los polipéptidos F_2 y F_1 incluyen la secuencia de aminoácidos recogida como posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en la columna 4 de la Tabla 5b, tal como una SEQ ID NO enumerada en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la columna 4 de la Tabla 5b, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Tabla 5b. Sustituciones de proteína F estabilizadas ejemplares y secuencias

	Descripción	Sustituciones	SEQ ID NO:
1	Disulfuro intracadena	S238C, E92C	421
2	Disulfuro intracadena	L193C, I59C	422
3	Disulfuro intracadena	I59C, L297C	423

4	Disulfuro intracadena	L297C, I292C	424
5	Disulfuro intracadena	K176C, S190C	425
6	Disulfuro intracadena	T189C, A177C	426
7	Disulfuro intracadena	T58C, K191C	427
8	Disulfuro intracadena	A424C, V450C	428
9	Disulfuro intracadena	L171C, K191C	429
10	Disulfuro intracadena	K176C, 5190C	430
11	Disulfuro intracadena	K77C, I217C	431
12	Disulfuro intracadena	K427C, D448C	434
13	Disulfuro intracadena	G151C, N302C	435
14	Disulfuro intracadena	G151C, V300C	436
15	Disulfuro intracadena	T189C, V56C	437
16	Disulfuro de intracadena	L171C, K191C	438

ii. Sustituciones de Aminoácido de Relleno de Cavidad

La comparación de la estructura de la conformación de prefusión de la proteína F de RSV (*p. ej.,* en complejo con D25 Fab como se describe en la presente) a la estructura de la proteína F de RSV de post-fusión (descrita, *p. ej.,* como se describe en McLellan *et al, J. Virol.,* 85, 7788, 2011) identifica varias cavidades o bolsas internas en la conformación de prefusión que deben colapsar para que F transite a la conformación de post-fusión. Esas cavidades incluyen las enumeradas en la Tabla 6.

Por consiguiente, en varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión por una o más sustituciones de aminoácido que introduce un aminoácido que reduce el volumen de una cavidad interna que colapsan en la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. Por ejemplo, las cavidades se rellenan al sustituir aminoácidos con cadenas laterales gryes por aquellos con cadenas laterales pequeñas. Las cavidades pueden ser cavidades de intra-protómero o cavidades de inter-protómero. Un ejemplo de una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad de F de RSV para estabilizar la proteína RSV en su conformación de prefusión es una proteína F de RSV con sustituciones S190F y V207L. En otra realización, la sustitución de aminoácido de relleno de cavidad para estabilizar la proteína RSV en su conformación de prefusión de una proteína F de RSV incluye una sustitución S190F, S190L, S190W, S190H, S190M o S190Y.

La persona de experiencia ordinaria en la técnica puede usar métodos proporcionados en la presente para comparar las estructuras de las conformaciones de pre- y post-fusión de la proteína F de RSV para identificar cavidades adecuadas, y sustituciones de aminoácido para rellenar las cavidades identificadas. Cavidades ejemplares y sustituciones de aminoácidos para reducir el volumen de estas cavidades se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6. Sustituciones de aminoácidos de relleno de cavidades ejemplares

Fila	Cavidad/Cavidades	Sustituciones de A.A.	SEQ ID NO:
1	Ser190 y Val207	190F y 207L	191
2	Val207	207L y 220L	193
3	Ser190 y Val296	296F y 190F	196
4	Ala153 y Val207	220L y 153W	197
5	Val207	203W	248
6	Ser190 y Val207	83W y 260W	192
7	Val296	58W y 298L	195
8	Val90	87F y 90L	194
9	Ser190	190F, 190L, 190W, 190H, 190M, o 190Y	

Las cavidades indicadas son referidas por un residuo pequeño que está contiguo a la cavidad que puede ser mutada a un residuo más grye para rellenar la cavidad. Se entenderá que otros residuos (además de la cavidad que se menciona después) también podrían ser mutados para rellenar la misma cavidad.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye una o más sustituciones de aminoácido que reducen el volumen de una o más de las cavidades enumeradas en la columna 2 de la Tabla 6, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV

recombinante que incluye una o más de las sustituciones de aminoácido enumeradas en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de la columna 3 de la Tabla 6, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 6 recogen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, así como un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la columna 4 de la Tabla 6, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, como se recoge en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la columna 4 de la Tabla 6, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 3 de la Tabla 6b, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 6a recogen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas de un péptido señal, el polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 4 de la Tabla 6b, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluya un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, como se recoge en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 4 de la Tabla 6b, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Tabla 6b. Sustitución de aminoácido de relleno de cavidad ejemplar

	Descripción	Mutaciones	SEQ ID NO
1	Relleno de cavidad	L230F	391
2	Relleno de cavidad	L158F	392
3	Relleno de cavidad	L230F, L158F	393
4	Relleno de cavidad	L203F	395
5	Relleno de cavidad	V187F	396
6	Relleno de cavidad	Y198F	397
7	Relleno de cavidad	Y198W	398
8	Relleno de cavidad	L204F	399
9	Relleno de cavidad	Y53F, L188F	400
10	Relleno de cavidad	V187F, L203F	401
11	Relleno de cavidad	Y198F, L203F	402
12	Relleno de cavidad	L141W	403

13	Relleno de cavidad	L142F	404
14	Relleno de cavidad	L142W	405
15	Relleno de cavidad	V144F	406
16	Relleno de cavidad	V144W	407
17	Relleno de cavidad	V90F	408
18	Relleno de cavidad	L83F	409
19	Relleno de cavidad	V185F, T54A	410
20	Relleno de cavidad	I395F	411
21	Relleno de cavidad	V90F, V185F, T54A	412
22	Relleno de cavidad	L83F, V90F	413
23	Relleno de cavidad	L83F, V185F, T54A	414
24	Relleno de cavidad	L230F, V90F, I395F	415
25	Relleno de cavidad	I395F, V 185F, T54A	416
26	Relleno de cavidad	L203F, V90F, L230F, L158F, S509F, I395F, V185F, T54A	417
27	Relleno de cavidad	I221Y	419
28	Relleno de cavidad	F140W	439
29	Relleno de cavidad	F137W	440
30	Relleno de cavidad	S190L, V192L	441
31	Relleno de cavidad	V187F, S190L, V192L	442
32	Relleno de cavidad	V187L, S190L, V192L	443
33	Relleno de cavidad	V185F, V187L, S190L, V192L	444
34	Relleno de cavidad	V154L, V157L, V185L, V187L	445
35	Relleno de cavidad	V154L, V185L, V187L	446
36	Relleno de cavidad	V187F	447
37	Relleno de cavidad	T58L A298L	448
38	Relleno de cavidad	T58L, V154L, V185L, V187L, A298L	449
39	Relleno de cavidad	Y458W	450
40	Relleno de cavidad	L158F, I167A	451
41	Relleno de cavidad	L158W, I167A	452
42	Relleno de cavidad	L158F	453
	Relleno de cavidad	L158W	454
43	Relleno de cavidad	V56L, I167L, A298L	455
44	Relleno de cavidad	V56L, I167L, A298M	456
45	Relleno de cavidad	V56L, A167L	457
46	Relleno de cavidad	I167F	458
47	Relleno de cavidad	I167M	459
48	Relleno de cavidad	V154F	460
49	Relleno de cavidad	V56L, I167L, A298L, V154F	461
50	Relleno de cavidad	I199L, L203F	462
51	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205Q, I206T	463
52	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205E, I206K	464
53	Relleno de cavidad	I199L, L203F, V207F	465
54	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205Q, I206T, V207F	466
55	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205E, I206K, V207F	467
56	Relleno de cavidad	I199L, L203F, L83F	468
57	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205Q, I206T, L83F	469
58	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205E, I206K, L83F	470
59	Relleno de cavidad	I199L, L203F, S190L, V192L	471
60	Relleno de cavidad	I199L, L203F, P205Q, I206T, V187F, S190L, V192L	472
61	Relleno de cavidad	S55A, 5190M, L203F, V207I, V296I	473
62	Relleno de cavidad	Y53F, S55A, K176I, S190L, V207I, S259L, D263L, V296I	474
63	Relleno de cavidad	L158F, V207M, V296I	475
64	Relleno de cavidad	V56L, V207M, V296I	476
65	Relleno de cavidad	V56L, V207I, V296I	477
66	Relleno de cavidad	V56I, V207M, V296I	478
67	Relleno de cavidad	V154L, V207M, V296I	479
68	Relleno de cavidad	Y198F, V207I, T219W, V296I	480
69	Relleno de cavidad	Y198F, V207I, T219I, V296I	481
70	Relleno de cavidad	Y198F, V207M, T219W, V296I	482
71	Relleno de cavidad	Y198F, V207M, T219I, V296I	483
72	Relleno de cavidad	Y198F, V207M, T219L, V296I	484
73	Relleno de cavidad	S190Y	432
74	Relleno de cavidad	S190W	433

75	Relleno de cavidad	I206F, V207M, T219V, V296I	487
76	Relleno de cavidad	Y198F, V207M, T219L, K226M	488
77	Relleno de cavidad	Y198F, V207M, T219L, K226W	489
78	Relleno de cavidad	Y198F, V207M, T219L, K226L	490
79	Relleno de cavidad	L158F, L203F, V207I, V296I	497
80	Relleno de cavidad	F488W	498
81	Relleno de cavidad	F488R	499
82	Relleno de cavidad test 207L	V207L	500
83	Relleno de cavidad test 207L	S190F	501
84	Relleno de cavidad	S190M	502

iii. Sustituciones de Reempaquetamiento

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión por uno o más sustituciones de aminoácido de reempaquetamiento. Las sustituciones de reempaquetamiento incrementan las interacciones atractivas (tales como interacciones hidrofóbicas o formación de enlaces hidrógeno) o disminuyen las interacciones repulsivas (tales como las fuerzas repulsivas entre agrupaciones de residuos similarmente cargados), entre aminoácidos en una proteína.

La persona de experiencia ordinaria en la técnica puede utilizar métodos proporcionados en la presente para comparar las estructuras de las conformaciones de pre- y post-fusión de la proteína F de RSV para identificar sitios adecuados de interacciones repulsivas y/o atractivas entre los residuos de proteína F de RSV y sustituciones de aminoácido para reducir o incrementar estas interacciones, respectivamente. Por ejemplo, al identificar las interacciones repulsivas en la estructura de la proteína F de RSV en la conformación de prefusión proporcionada en la presente y al introducir sustituciones que reducen estas interacciones repulsivas. Alternativamente, la proteína F de RSV puede incluir sustituciones que incrementan las interacciones atractivas entre los residuos de proteína F de RSV en la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, pero no la conformación de post-fusión de la proteína F de RSV. Sustituciones de aminoácidos ejemplares se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7. Sustituciones de Aminoácido de Reempaquetamiento

Fila	Substituciones	SEQ ID NO
1	I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	227
2	I64L, I79L, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, I214L	228
3	I64W, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	229
4	I79V, Y86F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	230
5	I64V, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199Y, L203F, V207L, I214L	231
6	I64F, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	232
7	I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, I199F, L203F, V207L, 1214L	233
8	V56I, T58I, V164I, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296I, A298I	234
9	V56I, T58I, V164I, V179L, T189F, I291V, V296I, A298I	235
10	V56L, T58I, L158W, V164L, I167V, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296L	236
11	V56L, T58I, L158Y, V164L, I167V, V187I, T189F, I291V, V296L	237
12	V56I, T58W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, I291V, V296I	238
13	V56I, T58I, I64L, I79V, Y86W, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I29IV, V296I, A298I	239
14	V56I, T58I, I79V, Y86F, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I29IV, V296I, A298I	240
15	V56I, T58W, I64L, I79V, Y86W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I	241
16	V56I, T58W, I79V, Y86F, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I	242
17	D486N, E487Q, D489N, y S491A	249
18	D486H, E487Q, y D489H	250
19	T400V, D486L, E487L, y D489L	251
20	T400V, D486I, E487L, y D489I,	252
21	T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, y K498L	253
23	T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, y K498L	254
24	K399I, T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, E497L, y K498L	255
25	K399I, T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, E497L, y K498L	256
26	L375W, Y391F, y K394M	286
27	L375W, Y391F, y K394W	287
28	L375W, Y391F, K394M, D486N, E487Q, D489N, y S491A	288

29	L375W, Y391F, K394M, D486H, E487Q, y D489H	289
30	L375W, Y391F, K394W, D486N, E487Q, D489N, y S491A	290
31	L375W, Y391F, K394W, D486H, E487Q, y D489H	291
32	L375W, Y391F, K394M, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, y K498M	292
33	L375W, Y391F, K394M, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, y K498M	293
34	L375W, Y391F, K394W, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, y K498M	294
35	L375W, Y391F, K394W, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, y K498M	295
36	F137W y R339M	326
37	F137W y F140W	327
38	F137W, F140W, y F488W	328
39	D486N, E487Q, D489N, S491A, y F488W	329
40	D486H, E487Q, D489H, y F488W	330
41	T400V, D486L, E487L, D489L, y F488W	331
42	T400V, D486I, E487L, D489I, y F488W	332
43	D486N, E487Q, D489N, S491A, F137W, y F140W	333
44	D486H, E487Q, D489H, F137W, y F140W	334
45	T400V, D486L, E487L, D489L, F137W, y F140W	335
46	L375W, Y391F, K394M, F137W, y F140W	336
47	L375W, Y391F, K394M, F137W, F140W, y R339M	337

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye las sustituciones de aminoácidos enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 de la columna 2 de la Tabla 7, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Las SEQ ID NOs listadas en la Tabla 7 recogen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, así como un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 de la columna 3 de la Tabla 7, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 como se recoge en las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, como se recoge en una cualquiera de las SEQ ID NOs enumeradas en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 de la columna 3 de Tabla 7, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Varias realizaciones incluyen combinaciones de las sustituciones de aminoácido arriba enumeradas.

iv. Sitios de Glicosilación N-Enlazados

La comparación de la estructura de la conformación de prefusión de la proteína F de RSV (*p. ej.,* en complejo con D25 o AM22 como se describe en la presente) a la estructura de la proteína F de RSV de post-fusión (descrita, *p. ej.,* como se describe en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011) identifica varias regiones de la proteína F de RSV que son accesibles al disolvente en la conformación F de RSV de prefusión descrita en la presente, pero inaccesibles al disolvente en la conformación F de RSV de post-fusión (como se describe en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011).

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye una sustitución de aminoácido que introduce un sitio de glicosilación N-enlazado en una posición que es accesible al disolvente en la conformación F de RSV de prefusión descrita en la presente, pero inaccesible al disolvente en la conformación F de RSV de post-fusión (como se describe en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011). Estas sustituciones de aminoácido estabilizan la proteína F de RSV recombinante en la conformación de prefusión al incrementar la energía requerida para que la proteína adopte el estado de post-fusión.

Para crear un sitio de glicosilación N-enlazado, se necesita introducir la secuencia Asn-X-Ser/Thr (en que X es

cualquier aminoácido excepto Pro). Esto se puede realizar mediante la sustitución de dos residuos de aminoácido Ser/Thr C-terminal a un residuo Asn nativo, o mediante la sustitución de dos residuos de aminoácido Asn N-terminales a un residuo Ser/Thr nativo, o mediante la sustitución de tanto un residuo Asn como Ser/Thr separado por un aminoácido no de prolina. Poor lo tanto, en varias realizaciones, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas están glicosiladas. Por ejemplo, la proteína F de RSV incluye una sustitución de aminoácido que introduce un sitio de glicosilación N-enlazado en la proteína F de RSV que es accesible al disolvente en la conformación F de RSV de prefusión descrita en la presente pero inaccesible al disolvente en la conformación de post-fusión de F de RSV como se describe en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011). Modificaciones del sitio de glicosilación N-enlazado ejemplares se proporcionan en la Tabla 8.

Tabla 8. Glicosilación N-enlazada Ejemplar

Fila	Posición del sitio de glicosilación N-enlazado	Sustituciones ejemplares	SEQ ID NO Ejemplar
1	506	I506N y K508T	198
2	175	A177S	199
3	178	V178N	200
4	276	V278T	203
5	476	Y478T	204
6	185	V185N y V187T	214
7	160	L160N y G162S	215
8	503	L503N y a F505S	216
9	157	V157N	217

En algunas realizaciones, un antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante un sitio de glicosilación N-enlazado en una más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) posiciones 506, 175, 178, 276, 476, 185, 160, 503 o 157 del polipéptido F_1, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Por ejemplo, el polipéptido F_1 puede incluir una sustitución de aminoácido que introduce un sitio de glicosilación N-enlazado en una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) posiciones 506, 175, 178, 276, 476, 185, 160, 503 o 157 del polipéptido F_1.

Las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 8 exponen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, así como un péptido señal, el polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye las sustituciones I506N y K508T para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 506. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye una sustitución A177S para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 175. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye una sustitución V178N para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 178. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye una sustitución V278T para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 276. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye una sustitución Y478T para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 476. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye las sustituciones V185N y V187T para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 185. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye las sustituciones L160N y G162S para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 160. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye las sustituciones L503N y F505S para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 503. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye un polipéptido F_1 que incluye una sustitución V157N para introducir un sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 157. En cualquiera de estas realizaciones, el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión específico (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En realizaciones adicionales, el polipéptido F_1 comprende los residuos 137-513 de SEQ ID NO: 198 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 506); SEQ ID NO: 199 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 175); SEQ ID NO: 200 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 178); SEQ ID NO: 203 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 276); SEQ ID NO: 204 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 476); SEQ ID NO: 214 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 185); SEQ ID NO: 215 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 160); SEQ ID NO: 216 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 503); o SEQ ID NO: 217 (sitio de glicosilación N-enlazado en la posición 157), en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Métodos para hacer polipéptidos glicosilados se describen en la presente y son familiares para la persona de experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, métodos de este tipo se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2007/0224211, las Patentes de los Estados Unidos Nºs 7,029,872; 7,834,159, 7,807,405, Wang y Lomino, ACS Chem. Biol., 7:110-122, 2011, y Nettleship *et al.*, Methods Mol. Biol, 498:245-263, 2009. En algunas realizaciones, los antígenos PreF glicosilados se producen al expresar la proteína F de RSV recombinante en células de mamífero, tales como células HEK293 o derivados de las mismas, tales como células GnTI$^{-/-}$ (ATCC® Nº CRL-3022). En algunas realizaciones, los antígenos de proteína F de RSV se producen mediante la expresión de los antígenos de proteína F de RSV en células de mamífero, tales como células HEK293 o derivados de las mismas, con swainsonina añadida al medio con el fin de inhibir ciertos aspectos de la maquinaria de glicosilación, por ejemplo para fomentar la producción de glicanos híbridos.

En varias realizaciones, el polipéptido F_1 incluye dos o más de los sitios de glicosilación N-enlazados enumerados en la Tabla 8.

v. Modificaciones estabilizantes ejemplares

La persona de experiencia en la técnica apreciará que el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L (en comparación con una proteína F de RSV nativa como se expone en una de SEQ ID Nos: 1-184) y combinaciones de una o más de las sustituciones de aminoácido estabilizantes descritas en la presente, tal como una combinación de sustituciones de aminoácido que introducen uno o más enlaces disulfuro, rellenar cavidades dentro de la proteína F de RSV, alterar el empaquetamiento de residuos en la proteína F de RSV, introducir sitios de glicosilación N-enlazados. Por ejemplo, en varias realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye sustituciones de aminoácido que introducen un enlace disulfuro, y que rellena las cavidades dentro de la proteína F de RSV.

En algunas realizaciones, una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190; o un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190, y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 207. Por ejemplo, la sustitución de relleno de cavidad en la posición 190 y/o posición 207 puede ser una sustitución de aminoácido aromático o hidrófobo grye (tal como tirosina, leucina, fenilalanina, histidina o triptófano).

En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190F. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190W. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190L.

En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207L. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207L. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207F. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207F. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207F. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207W. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207W. En algunas realizaciones, el polipéptido F_1 de la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207W.

En varias realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 de un subtipo A de RSV humana, un subtipo B de RSV humano o un RSV bovino, en donde el polipéptido F_1 incluye una de las combinaciones anteriores de sustituciones estabilizantes.

En algunos aspectos de la divulgación, que no forman parte de la invención, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190F. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y,

además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190W. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190L. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190H. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190M. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190Y.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207L. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207L. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190H y V207L. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190M y V207L. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190Y y V207L.

En algunos aspectos de la divulgación, que no forman parte de la invención, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207F. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207F. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207F. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190H y V207F. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190M y V207F. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190Y y V207F.

En algunos aspectos de la divulgación, que no forman parte de la invención, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207W. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207W. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207W. En algunos

aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190H y V207W. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190M y V207W. En algunos aspectos, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190Y y V207W.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F, V207L y F488W. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370 y, además, incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y F488W.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L). Otros aspectos de la divulgación, que no forman parte de la invención, incluyen SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C, S290C y S190F); o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión que incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 3 de la Tabla 8b. Las sustituciones de aminoácidos establecidas en las filas 25-40 no forman parte de la invención reivindicada. La proteína F de RSV estabilizada puede estar unida específicamente mediante un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Tabla 8b: Sustituciones de proteína F de RSV recombinante ejemplares y secuencias con y sin un dominio Foldon escindible de trombina C-terminal

	Descripción	Mutaciones	Sin dominio Foldon SEQ ID NO	Con dominio Foldon Escindible de Trombina SEQ ID NO
1	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K	503	552
2	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K/F505W	504	553
3	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K/L230F/L158F	505	554
4	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L503E/I506K/S509F/F505W/ L230F/L158F	506	555
5	DSCav1 + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/N384T/ I431S/L467Q/	507	556
6	DSCav1 + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	508	557
7	DSCav1 + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/ L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q /I506K	509	558

8	DSCav1 + ds	(S155C, S290, S190F, V207L) + (L512C/L513C)	510	559
9	DSCav1 + ds + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + (L512C/L513C) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	511	560
10	DSCav1 + ds + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + (L512C/L513C) + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	512	561
11	DSCav1 + ds + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + (L512C/L513C) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	513	562
12	DSCav1 + relleno de cavidad	(S155C, S290, S190F, V207L) + F505W	514	563
13	DSCav1 + relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + F505W + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	515	564
14	DSCav1 + relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + F505W + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	516	565
15	DSCav1 + relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + F505W + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	517	566
16	DSCav1 + ds + relleno de cavidad	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W	518	567
17	DSCav1 + ds + relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	519	568
18	DSCav1 + ds + relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K	520	569
19	DSCav1 + ds + relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + L512C/L513C + F505W + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q/ I506K	521	570
20	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) +I506K/S509F/L83F/V90F	522	571
21	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/L83F/V90F/L230F/L158F	523	572
22	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/F505W/L83F/V90F/L230F/V185F/T54A	524	573
23	DSCav1 + Relleno de cavidad	(S155C, S290, S190F, V207L) + L83F/V90F/L230F/I395F	525	574
24	DSCav1 + Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290, S190F, V207L) + I506K/S509F/F505W/L83F/V90F/L230F/L158F/I395F/V185F/T54A	526	575
25	DS + S190F + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, I515C	527	576
26	DS + S190F + F488W + Estabilización de C-term plus más mutaciones	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, G515E, 516C	528	577
27	DS + S190F + F488W + Estabilización de C-term plus más mutaciones	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514C	529	578

28	DS + S190F + F488W + Estabilización de C-term plus más mutaciones	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	530	579
29	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, A514E, I515C	531	580
30	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, A514E, G515E, 516C	532	581
31	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514C	533	582
32	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	534	583
33	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra y 1 disulfuro de intercadena extra	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, 4A24C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, L514E, A515C	535	584
34	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra y 1 disulfuro de intercadena extra	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L513C, L514E, A515E, G516C	536	585
35	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra y 1 disulfuro de intercadena extra	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514C	537	586
36	DS + S190F + F488W + Estabilización de disulfuro de C-term plus más mutaciones plus 2 disulfuros de intracadena extra y 1 disulfuro de intercadena extra	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	538	587
37	DS + anillo de cisteína de estabilización C-term	(S155C, S290C) + L513C, 514E, 515C	539	588
38	DS + anillo de cisteína de estabilización C-term	(S155C, S290C) + L513C, 514E, 515E, 516C	540	589
39	DS + anillo de cisteína de estabilización C-term	(S155C, S290C) + L512C, 513E, 514C	541	590
40	DS + anillo de cisteína de estabilización C-term	(S155C, S290C) + L512C, 513E, 514E, 515C	542	591
41	DSCav1 + 512/513ds + terminación en el residuo 513	(S155C, S290C, S190F, V207L) + (L512C/L513C)	543	592
42	DSCav1 + terminación en el residuo 492	(S155C, S290C, S190F, V207L) + 486DEF a CPC	544	593
43	DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L)		601
44	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L512F	672	683
45	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L513F	673	684

46	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L512F, L513F	674	685
47	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L512Y, L513Y	675	686
48	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L512F, L513Y	676	687
49	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L512W, L513W	677	688
50	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + L5132W, L513Y	678	689
51	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + S509W	679	690
52	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + S509F	680	691
53	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + S509W, L512F	681	692
54	DSCav1 con mutaciones de relleno de cavidad C-terminal	S155C, S290C, S190F, V207L + S509W, L512F, L513F	682	693

Las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 8b exponen las secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))) o un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 (p. ej., aprox. las posiciones 137-513) y un polipéptido F_2 (p. ej., aprox. las posiciones 26-109) como se recoge en la SEQ ID NO de una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 4 (sin dominio Foldon) o la columna 5 (con dominio Foldon escindible) de la Tabla 8b. Las SEQ ID NOs de las filas 25-40 no forman parte de la invención reivindicada.

En algunos aspectos de la divulgación, que no forman parte de la invención, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión que incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la columna 3 de la Tabla 8c. La proteína F de RSV estabilizada puede estar unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 8c exponen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), un polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en aspectos adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 (p. ej., aprox. las posiciones 137-513) y un polipéptido F_2 (p. ej., aprox. las posiciones 26-109) como se expone en la SEQ ID NO de una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la columna 4 de la Tabla 8c.

Tabla 8c: Sustituciones de proteína F de RSV recombinante ejemplares y secuencias

	Descripción	Sustituciones	SEQ ID NO
1	Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	L503E/I506K/S509F	389
2	Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	L503E/I506K/S509F/F505W	390
3	Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	L503E/I506K/S509F/L230F/L158F	394
4	Disulfuro de intercadena	Q279C, S238C	418
5	Relleno de cavidad/parche hidrófobo	Q501F	420
6	relleno de cavidad + reemplazo hidrófilo	E82V/V207M/N227L/V296I	485
7	relleno de cavidad + reemplazo hidrófilo	E82V/V207I/N227L/V296I	486
8	relleno de cavidad + prevención de formación de hélice	L158F/Y198F/V207M/S215G/N216P/T219L	491

9	relleno de cavidad + prevención de formación de hélice	L158F/Y198F/V207M/S213G/S215G/T219L	492
10	relleno de cavidad + reemplazo hidrófilo	V56L/E82V/L203F/V207M/N227L/L230F/V296I	493
11	relleno de cavidad + reemplazo hidrófilo	E82V/L158F/L203F/V207M/N227L/L230F/V296I	494
12	relleno de cavidad + reemplazo hidrófilo	E82V/L203F/V207M/K226M/N227L/L230F/V296I	495
13	Disulfuro + relleno de cavidad	L203F/V207I/S180C/S186C/V296I	496

b. Modificaciones estabilizantes proximales a la membrana

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una forma anclada a la membrana de la proteína F de RSV recombinante (p. ej., con un dominio de transmembrana). En otras realizaciones, el antígeno PreF incluye una forma soluble de la proteína F de RSV recombinante (p. ej., sin un dominio de transmembrana u otro anclaje de membrana). Se entenderá que existen varios enfoques diferentes para generar una proteína F de RSV recombinante soluble o anclada a la membrana, incluyendo los comentados más adelante. Ejemplos incluyen la introducción de un dominio de trimerización, la introducción de pares de cisteína que pueden formar un enlace disulfuro que estabiliza la región C-terminal de F_1 y la introducción de un dominio de transmembrana (*p. ej.,* para aplicaciones que incluyen un antígeno PreF anclado a la membrana).

Además, como se describe en la presente, la estructura de la proteína F de RSV en complejo con D25 Fab (*es decir*, en una conformación de prefusión) comparada con la estructura de la proteína F de RSV de post-fusión (descrita, *p. ej.,* en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011, con las coordenadas depositadas como Acceso de PDB Nº 3RRR) muestran reordenamientos estructurales entre las conformaciones de pre- y post-fusión en los lóbulos tanto proximales a la membrana como distales a la membrana. Varias realizaciones incluyen una modificación fijada como objetivo para la estabilización del lóbulo proximal a la membrana de la conformación de prefusión de proteína F de RSV. Se entenderá que estas modificaciones no son estrictamente necesarias para estabilizar una proteína F de RSV recombinante en una conformación de prefusión, sino que, en algunos casos, se combinan con otras modificaciones estabilizantes de prefusión, tales como las arriba descritas.

i. Dominio de Trimerización

En varias realizaciones, el antígeno PreF se enlaza a un dominio de trimerización, por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 con un dominio de trimerización enlazado a su extremo C. En algunas realizaciones, el dominio de trimerización fomenta la trimerización de los tres monómeros F1/F2 en la proteína F de RSV recombinante. Varios dominios de multimerización exógenos fomentan trímeros estables de proteínas recombinantes solubles: la cremallera de leucina GCN4 (Harbury *et al.,* 1993 *Science* 262:1401-1407), el motivo de trimerización de la proteína de tensioactivo de pulmón (Hoppe *et al.,* 1994 *FEBS Lett* 344:191-195), colágeno (McAlinden *et al.,* 2003 *J Biol Chem* 278:42200-42207) y el Foldon de fibritina T4 de fago (Miroshnikov *et al.,* 1998 *Protein Eng* 11:329-414), cualquiera de los cuales se puede enlazar al polipéptido F1 en el antígeno PreF para fomentar la trimerización de la proteína F recombinante, siempre que el antígeno PreF esté unido específicamente mediante un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluya una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunos ejemplos, el antígeno PreF se puede enlazar a un dominio de cremallera de leucina GCN4, por ejemplo el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 con un dominio de cremallera de leucina GCN4 enlazado a su extremo C. En ejemplos específicos, el dominio de cremallera de leucina GCN4 se proporciona en la serie CSGJ de construcciones descritas en la presente.

En algunos ejemplos, el antígeno PreF se puede enlazar a un dominio Foldon, por ejemplo, el antígeno PreF puede incluir una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 con un dominio Foldon enlazado a su extremo C. En ejemplos específicos, el dominio Foldon es un dominio Foldon de fibritina T4 tal como la secuencia de aminoácidos GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTF (SEQ ID NO: 351), que adopta una conformación β-propulsora, y puede plegarse y trimerizarse de una manera autónoma (Tao *et al.* 1997 *Structure* 5:789-798).

En algunos ejemplos específicos, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante enlazada a un dominio Foldon de fibritina T4, incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 enlazado a un dominio Foldon como se expone en una de SEQ ID NOs: 185, 189-303 o 371-376. Típicamente, el motivo de multimerización heterólogo está situado en posición C-terminal con respecto al dominio F_1. Opcionalmente, el dominio de multimerización está conectado al polipéptido F_1 a través de un enlazador, tal como un enlazador de aminoácido, tal como la secuencia GG. El enlazador también puede ser un enlazador más largo (por ejemplo, que incluye la secuencia GG, tal como la secuencia de aminoácidos: GGSGGSGGS; SEQ ID NO: 352). Numerosos enlazadores conformacionalmente neutros son conocidos en la técnica, los cuales se pueden utilizar en este contexto sin interrumpir la conformación del antígeno PreF. Algunas realizaciones incluyen un sitio de escisión de proteasa para eliminar el dominio Foldon del polipéptido F1, tal como, pero no limitado a, un sitio de trombina entre el polipéptido F1 y el dominio Foldon.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de dominio de trimerización arriba enumeradas, combinadas con cualquiera de las modificaciones enumeradas en la sección II.B.1.a. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de dominio de trimerización listadas en lo anterior en combinación con una o más de las modificaciones de enlace disulfuro enumeradas en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o 51 de la Tabla 5, y/o una o más de las modificaciones de relleno de la cavidad enumeradas en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la Tabla 6, y/o una o más de las modificaciones de reempaquetamiento enumeradas en una de las filas 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 de la Tabla 7, y/o una o más de las modificaciones de glicosilación enumeradas en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de la Tabla 8, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de dominio de trimerización arriba enumeradas, enlazadas a un polipéptido F1 que incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, una sustitución de aminoácido de relleno de la cavidad en la posición 190 y una sustitución de aminoácido de relleno de la cavidad en la posición 207.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de dominio de trimerización arriba enumeradas enlazadas a un polipéptido F1 que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190F y V207L.

Por ejemplo, en algunos aspectos de la divulgación, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 285 o SEQ ID NO: 263; o las posiciones 26-109 y 137-545, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298 o SEQ ID NO: 299, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Otras SEQ ID NOs que no forman parte de la invención incluyen: SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C y S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C, S290C y S190F); o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F), en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye un conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 de un subtipo A de RSV humano, un subtipo B de RSV humano o un RSV bovino, en donde el polipéptido F_1 está enlazado a cualquiera de las modificaciones de dominio de trimerización arriba enumeradas, y el polipéptido F1 incluye, además, las modificaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L descritas en la presente.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, e incluye una o más sustituciones de aminoácido de relleno de la cavidad y un dominio Foldon, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio Foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una

cualquiera de SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 195 o SEQ ID NO: 194; y en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, e incluye una o más sustituciones de aminoácidos de reempaquetamiento y un dominio foldon, el donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 334, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 336 o SEQ ID NO: 337; en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, e incluye uno o más sitios de glicosilación N-enlazados y un dominio Foldon, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio Foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NOs seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216 o SEQ ID NO: 217; en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la columna 3 de la Tabla 5b, en donde el polipéptido F1 de la proteína F de RSV recombinante está enlazado a un dominio Foldon. Algunas realizaciones incluyen un sitio de escisión de proteasa para eliminar el dominio Foldon del polipéptido F1, por ejemplo un sitio de escisión de trombina.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 enlazado a un dominio Foldon, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio Foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una de las SEQ ID NOs enumeradas en una de la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la columna 4 de la Tabla 5b. En varias realizaciones, el polipéptido F_1 enlazado al dominio Foldon incluye, además, un sitio de escisión de proteasa, tal como, pero no limitado a un sitio de trombina, entre el polipéptido F1 y el dominio Foldon.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 3 de la Tabla 6b, en donde el polipéptido F1 de la proteína F de RSV recombinante está enlazado a un dominio Foldon.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 enlazados a un dominio Foldon, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio Foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de una de las SEQ ID NOs enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 4 de la Tabla 6b.

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, en donde la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 3 de Tabla 8b, en donde el polipéptido F1 de la proteína F de RSV recombinante está enlazado a un dominio Foldon. Las sustituciones de aminoácidos enumeradas en las filas 25-40 no forman parte de la invención. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 enlazado a un dominio Foldon, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio Foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544,

respectivamente, de una de las SEQ ID NOs enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 5 de la Tabla 8b. Las SEQ ID NOs enumeradas en las filas 25-40 no forman parte de la invención. Estas secuencias incluyen un sitio de escisión de trombina entre el polipéptido F1 y el dominio Foldon.

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, en donde la proteína F de RSV recombinante incluye las sustituciones de aminoácido enumeradas en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la columna 3 de la Tabla 8c, en donde el polipéptido F1 de la proteína F de RSV recombinante está enlazada a un dominio Foldon. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión de proteína F de RSV, que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 enlazados a un dominio Foldon, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio Foldon incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-544, respectivamente, de la SEQ ID NO enumerada en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la columna 4 de la Tabla 8c.

También se pueden utilizar dominios Foldon modificados, tal como un dominio Foldon que incluye una secuencia de aminoácidos expuesta como GYIPEAPRDGQCYVRCDGEWVLLSTF (SEQ ID NO: 694), GYIPECPRDGQAYVCKDGEWVLLSTF (SEQ ID NO: 695), GYIPEAPRDGQCYCRKDGEWVLLSTF (SEQ ID NO: 696) o GYIPEAPRDGQACVRKDGECVLLSTF (SEQ ID NO: 697). Estos dominios Foldon modificados incluyen sustituciones de aminoácido que añaden dos residuos cisteína para la formación de enlaces disulfuro estabilizantes. Secuencias de proteína F de RSV ejemplares que incluyen las sustituciones de aminoácido de DSCav1 enlazadas a los dominios Foldon modificados incluyen las expuestas como SEQ ID NO: 651, SEQ ID NO: 652, SEQ ID NO: 653 y SEQ ID NO: 654. En algunas realizaciones, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas se pueden enlazar a un dominio Foldon modificado como se describe en la presente.

ii. Enlaces Disulfuro

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 que incluye uno o más enlaces disulfuro que se utilizan para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV recombinante. Los residuos cisteína que forman el enlace disulfuro se pueden introducir en la proteína F de RSV recombinante mediante las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L relevantes.

La ubicación de la cisteína (o cisteínas) de un enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV en una conformación de prefusión se puede determinar fácilmente por la persona de experiencia ordinaria en la técnica utilizyo métodos descritos en la presente y familiares para la persona experta. En algunas realizaciones, un anillo de enlaces disulfuro se introduce en el extremo C del polipéptido F1 al sustituir los residuos cisteína con aminoácidos de la hélice α10. Las tres hélices α10 del ectodominio F de RSV para un bucle-bucle que estabilizó la porción proximal a la membrana de la proteína. Cuyo se expresa en células, los enlaces disulfuro de inter-protómero se forman entre las cisteínas introducidas en la hélice α10, para de esta manera "bloquear" las tres hélices α10 en estrecha proximidad y prevenir el movimiento del dominio proximal a la membrana de la conformación de pre- a post-fusión. La hélice α10 de la proteína F de RSV incluye los residuos 492 al dominio de transmembrana (residuo 529).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones 486 y 487 de F de RSV, o entre los residuos cisteína ubicados en las posiciones 512 y 513 de F de RSV, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En algunas de realizaciones de este tipo, el polipéptido F_1 incluye las sustituciones D486C y E487C, las sustituciones L512C y L513C o las sustituciones D486C, E487C, L512C y L513C, respectivamente.

En algunas realizaciones, los aminoácidos se pueden insertar (o suprimir) de la secuencia de proteína F para ajustar el alineamiento de los residuos en la estructura de la proteína F, de modo que pares de residuos particulares están dentro de una distancia suficientemente cercana para formar un enlace disulfuro. En algunas realizaciones de este tipo, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro entre los residuos cisteína ubicados en 486 y 487; con una inserción de prolina entre las posiciones 486 y 487, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En algunas realizaciones de este tipo, el polipéptido F_1 incluye las sustituciones D486C y E487C, y una inserción de prolina entre las posiciones 486 y 487.

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro entre un residuo cisteína ubicado en la posición 493 y un residuo cisteína insertado entre las

posiciones 329 y 330, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En algunas realizaciones de este tipo, el polipéptido F_1 incluye la sustitución S493C y un residuo cisteína insertado entre las posiciones 329 y 330.

En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un enlace disulfuro entre un residuo cisteína ubicado en la posición 493 y un residuo cisteína insertado entre las posiciones 329 y 330 e incluye, además, una inserción de glicina entre los residuos 492 y 493, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En algunas realizaciones de este tipo, el polipéptido F_1 incluye la sustitución S493C, un residuo cisteína insertado entre las posiciones 329 y 330 y una inserción de glicina entre los residuos 492 y 493.

En realizaciones adicionales, la proteína F de RSV recombinante incluye sustituciones de cisteína en la hélice α10 en las posiciones 525 y 526, 512 y 513 y/o 519 y 520, que pueden formar enlaces disulfuro de interprotómero para estabilizar la región C-terminal del polipéptido F1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye cualquiera de los "motivos" enumerados en la Tabla 23. En realizaciones adicionales, la proteína F de RSV recombinante incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 80 % (tal como por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 98 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos expuesta como una cualquiera de SEQ ID NOs: 829-1025 o 1456-1468, opcionalmente sin incluir las etiquetas de purificación o dominios de trimerización incluidos en estas secuencias.

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye, extendiéndose de C-terminal desde la posición 512, la secuencia de aminoácidos expuesta como una de CCHNVNAGKSTTN (residuos 512-524 de SEQ ID NO: 844) o CCHNVNACCSTTN (residuos X-Y de SEQ ID NO: 849); o CCHNVNACCSTTNICCTT (residuos 512-529 de SEQ ID NO: 853).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro anteriores para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV, combinado con cualquiera de las modificaciones de estabilización enumeradas en la sección II.B.1.a. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV enumerada en lo anterior en combinación con las sustituciones de enlace disulfuro enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o 51 de la Tabla 5, o la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la Tabla 5b, o las sustituciones de relleno de cavidad enumeradas en una de la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la Tabla 6, o una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 3 de la Tabla 6b, o las sustituciones de reempaquetamiento enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 de la Tabla 7, o las modificaciones de glicosilación enumeradas en una de la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de la Tabla 8, o las sustituciones enumeradas en la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 3 de la Tabla 8b, o las sustituciones enumeradas en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la columna 3 de la Tabla 8c, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV arriba enumerada y, además, incluye un polipéptido F1 que incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190; o un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190 y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 207.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV arriba enumeradas y, además, incluye un polipéptido F1 que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190F, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190W o las sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190L. En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV arriba enumerado y, además, incluye un polipéptido F1 que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L, las sustituciones de aminoácido S155C,

S290C, S190W y V207L, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207L, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207F, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207F, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207F, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207W, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207W o las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207W.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F_1 que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de cualquiera de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C y S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C, S290C y S190F); o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F), en donde la proteína F de RSV recombinante incluye, además, cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV arriba enumeradas, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Las SEQ ID NOs: 374-376 no forman parte de la invención reivindicada.

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 de un subtipo A de RSV humano, un subtipo B de RSV humano, un RSV bovino, en donde la proteína F de RSV recombinante incluye, además, cualquiera de las modificaciones de enlace disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV arriba enumeradas, y en donde el polipéptido F1 incluye, además, las modificaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L.

iii. Dominios de Transmembrana

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye un dominio de transmembrana enlazado al polipéptido F_1, por ejemplo, para una aplicación que incluye una antígeno PreF anclado a la membrana). Por ejemplo, la presencia de las secuencias de transmembrana es útil para la expresión como una proteína de transmembrana para la preparación de vesícula de membrana. El dominio de transmembrana puede estar enlazado a una proteína F_1 que contiene las mutaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L proporcionadas en la presente, por ejemplo, las arriba descritas, tal como una proteína F_1 con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L. Adicionalmente, el dominio de transmembrana se puede enlazar, además, a una cola citosólica de F_1 de RSV. Ejemplos que incluyen un péptido de señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de transmembrana de RSV se proporcionan como SEQ ID NO: 323 (sin un dominio citosólico) y SEQ ID NO: 324 (con un dominio citosólico).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana, combinado con cualquiera de las modificaciones de estabilización enumeradas en la sección II.B.1.a. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana e incluye, además, las sustituciones de enlace disulfuro enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o 51 de la Tabla 5, o la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de la Tabla 5b, o las sustituciones de relleno de cavidad enumeradas en una de la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la Tabla 6, o una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 u 84 de la columna 3 de la Tabla 6b, o las sustituciones de reempaquetamiento enumeradas en una de la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 de la Tabla 7, o las modificaciones de glicosilación enumeradas en una de la fila 1, 2, 3, 4 , 5, 6, 7, 8 o 9 de la Tabla 8, o las sustituciones enumeradas en la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 50, 51, 52, 53 o 54 de la columna 3 de la Tabla 8b, o las sustituciones enumeradas en la fila 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la columna 3 de la Tabla 8c, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana, en donde el polipéptido F1 incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, y una sustitución de aminoácidos de relleno de cavidad en la posición 190; y una sustitución de aminoácidos de relleno de cavidad en la posición 207.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un

polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana, en donde el polipéptido F1 incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L, además, sustituciones de aminoácido pueden incluir: sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190W o sustituciones de aminoácido S155C, S290C y S190L. En realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana, en donde el polipéptido F1 incluye, además, las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L, otras sustituciones de aminoácido pueden incluir: sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207L, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207L, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207F, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207F y sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207F, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207W, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207W o sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207W.

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_2 y un polipéptido F1 enlazados a un dominio de transmembrana, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados al dominio de transmembrana incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C y S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C S290C y S190F); o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F), en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Las SEQ ID NOs: 374-376 no forman parte de la invención reivindicada.

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 de un subtipo A de RSV humano, un subtipo B de RSV humano o un RSV bovino, en donde el polipéptido F_1 está enlazado a cualquiera de las dominios de transmembrana arriba enumerados y el polipéptido F1 además incluye las modificaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L.

iv. Sustituciones de relleno de cavidad

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 que incluye una o más sustituciones de relleno de cavidad que se utilizan para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV recombinante. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F1 con las sustituciones V207L y L512F; L513F; L512F y L513F; L512Y y L513Y; L512F y L513Y; L512W y L513W; L5132W y L513Y; S509W; S509F; S509W y L512F; o S509W, L512F y L513F, en donde el antígeno PreF está unido específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Secuencias ejemplares con sustituciones de este tipo incluyen SEQ ID NOs: 672-682.

c. Sitios antigénicos

En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que está estabilizada en una conformación de prefusión e incluye, además, una modificación para eliminar un sitio antigénico conocido diferente del sitio antigénico Ø. Por ejemplo, la proteína F de RSV recombinante puede incluir una modificación que interrumpe el sitio antigénico I, II o IV. Modificaciones de este tipo se pueden identificar, por ejemplo, uniendo anticuerpos específicos para estos sitios.

En algunas realizaciones, se proporcionan los antígenos que incluyen una proteína F de RSV recombinante que incluye la modificación para eliminar el sitio antigénico Ø. Antígenos de este tipo son útiles, por ejemplo, como reactivos de control.

Modificaciones ejemplares para eliminar el sitio antigénico Ø y/o el sitio antigénico II se enumeran en la Tabla 8c1.

Tabla 8c1: Sustituciones de proteína F de RSV recombinante ejemplares y secuencias

	Descripción	Sustituciones	SEQ ID NO
1	unión del sitio de inactivación Ø	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T +Avi-tag	655
2	unión del sitio de inactivación II	Q270T +Avi-tag	656
3	unión del sitio de inactivación II	N268R/K272E +Avi tag	657

4	unión del sitio de inactivación Ø	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T +Avi-tag	658
5	unión del sitio de inactivación II	Q270T +Avi-tag	659
6	unión del sitio de inactivación II	N268R/K272E +Avi-tag	660
7	unión del sitio de inactivación Ø y II	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T, Q270T + Avi-tag	661
8	unión del sitio de inactivación Ø y II	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T, N268R/K272E + Avi-tag	662
9	unión del sitio de inactivación Ø y II	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T, Q270T + Avi-tag	663
10	unión del sitio de inactivación Ø y II	K65N/N67T, P205N/V207T, K209N/S211T, N268R/K272E + Avi-tag	664

d. Proteínas F de RSV de cadena sencilla

En algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante es una proteína F de RSV de cadena sencilla, que incluye una cadena polipeptídica sencilla que incluye el polipéptido F_1 de RSV y el polipéptido F_2 de RSV. Las proteínas de F de RSV de cadena sencilla descritas no incluyen los sitios de escisión de furina que flanquean el polipéptido pep27 de la proteína F de RSV; por lo tanto, cuyo se producen en células, el polipéptido F no se escinde en los polipéptidos F1 y F2 separados. En varias realizaciones, las porciones restantes de los polipéptidos F_1 y F_2 se unen mediante un enlazador, tal como un enlazador peptídico.

En varias realizaciones, se produce una cadena polipeptídica sencilla que incluye las secuencias F_2, pep27 y F_1. Las proteínas F de RSV de cadena sencilla pueden incluir la secuencia pep27, o esta secuencia se puede suprimir. Además, en ejemplos en donde se suprime la secuencia pep27, un enlazador (tal como un enlazador peptídico) se puede colocar, opcionalmente, entre los polipéptidos F_2 y F_1 en la proteína F de RSV de cadena sencilla recombinante. En algunas realizaciones, una proteína F de RSV de cadena sencilla incluye la deleción de las posiciones 98-149 o 106-149 de F de RSV que elimina los dos sitios de escisión de furina, el polipéptido pep27 y el péptido de fusión. En algunas realizaciones, una proteína F de RSV de cadena sencilla incluye la deleción de las posiciones 98-136, 98-144, 98-149, 106-136, 104-144 o 106-144 de F de RSV.

En varias realizaciones, las mutaciones estabilizantes descritas en la presente (por ejemplo en las secciones (B.1.a) hasta (B.1.c) anteriores se incluyen en la proteína F de RSV de cadena sencilla. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína F de RSV de cadena sencilla incluye las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L. En algunas realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante en formato de cadena sencilla estabilizada en una conformación de prefusión que incluye, además, las sustituciones de aminoácido enumeradas en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de la columna 3 de la Tabla 8d. La proteína F de RSV estabilizada se puede unir específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Secuencias ejemplares se enumeran en la Tabla 8d. Las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 8d exponen secuencias de aminoácidos que incluyen las sustituciones indicadas, un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), un polipéptido F_1 (posiciones 137-513) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))) o un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). Por lo tanto, en realizaciones adicionales, el antígeno PreF incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 (p. ej., aprox. en las posiciones 137-513) y un polipéptido F_2 (p. ej., aprox. posiciones 26-109) como se expone en la SEQ ID NO enumerada en una de las filas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 de la columna 4 (sin dominio Foldon) o columna 5 (con dominio Foldon escindible) de la Tabla 8d. Mutaciones de proteína F de RSV de una cadena sencilla ejemplares, adicionales y secuencias se describen en la presente, por ejemplo como se describe en la Tabla 8e (p. ej., filas 34-43) y la Tabla 18.

Tabla 8d. Proteínas F de RSV recombinantes de cadena sencilla

	Descripción	Mutaciones	Sin dominio Foldon SEQ ID NO	Con dominio Foldon Escindible de Trombina SEQ ID NO
1	Ds de cadena sencilla	S155C, S290C	545	594
2	Cav1 de cadena sencilla	S190F, V207L	546	595
3	F488W de cadena sencilla	F488W	547	596

4	DSCav1 de cadena sencilla	(S155C, S290, S190F, V207L)	548	597
5	DS de cadena sencilla + F488W	(S155C, S290C) + F488W	549	598
6	Cav1 de cadena sencilla + F488W	(S190F, V207L) + F488W	550	599
7	DSCav1 de cadena sencilla + F488W	(S155C, S290, S190F, V207L) + F488W	551	600
8	añadir Cav1 a SEQ ID NO: 320 de cadena sencilla	añadir Cav1 a SEQ ID NO: 320 de cadena sencilla	665	
9	añadir Cav1, F488W a SEQ ID NO: 320 de cadena sencilla	añadir Cav1, F488W a SEQ ID NO: 320 de cadena sencilla	666	
10	añadir Cav1 a SEQ ID NO: 319 de cadena sencilla	añadir Cav1 a SEQ ID NO: 319 de cadena sencilla	667	
11	añadir Cav1, F488W a SEQ ID NO: 319 de cadena sencilla	añadir Cav1, F488W a SEQ ID NO: 319 de cadena sencilla	668	
12	cadena sencilla con enlazador mejorado	155C, S290C, S190F, V207L, enlazador GS entre 105/145		669 (no un Foldon escindible)
13	cadena sencilla con enlazador mejorado	155C, S290C, enlazador GS entre residuos 105 a 145	670	
14	cadena sencilla con enlazador mejorado	155C, S290C, enlazador GS entre residuos 105 a 145	671	

Las secuencias de proteínas F de RSV de cadena sencilla adicionales que se estabilizan en una confirmación de prefusión se proporcionan en la Tabla 19, que incluyen las proteínas F de RSV de cadena sencilla con dominios Foldon no escindibles, dominios Foldon escindibles y enlazados a subunidades de nanopartícula de proteína.

2. Inmunógenos del Sitio Mínimo Ø

El epítopo del sitio Ø de F de RSV se ubica en el ápice de la espiga del trímero e incluye la región reconocida por los tres anticuerpos neutralizantes D25, AM22 y 5C4. Más específicamente, como se delinea por la estructura cristalina del complejo F de RSV/D25, este epítopo comprende la superficie exterior de la hélice α4 (residuos 196-209) y el bucle adyacente (residuos 63-68) entre β2 y α1. Se proporcionan en la presente inmunógenos que incluyen estos aspectos mínimos de la proteína F de RSV y que son útiles, por ejemplo, para inducir una respuesta inmune a RSV, y también para la unión específica a los anticuerpos de proteína F de RSV, por ejemplo como sondas para identificar o detectar anticuerpos de este tipo.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la proteína F de RSV recombinante incluye la región mínima necesaria para estimular una respuesta inmune a RSV. En algunas realizaciones, la proteína F de RSV incluye o consiste en una secuencia de aminoácidos por lo menos 80 % idéntica a una secuencia expuesta en la Tabla 20. En realizaciones adicionales, la proteína F de RSV recombinante comprende una permutación circular del sitio antigénico Ø como se expone en la Tabla 20, tal como se expone en las SEQ ID NOs: 1027-1052.

La región de epítopo mínima puede estar enlazada a una proteína de armazón para estabilizar el epítopo en una conformación antigénica. Por ejemplo, cualquiera del antígeno de sitio mínimo Ø enumerado en la presente se puede enlazar a una proteína de estructura 2KNO, 2A90, 2W59, 3U2E, 2VJ1, 1CHD, 1PQZ o 2MOE. Estos son los identificadores de referencia para secuencias específicas ubicadas en la base de datos de PDB, como se presentan en la base de datos el 11 de marzo de 2014. Ejemplos específicos del antígeno de sitio mínimo Ø enlazado a una proteína de armazón se proporciona en la presente en la Tabla 20.

Cualquiera del antígeno de sitio mínimo Ø se puede enlazar a una subunidad de nanopartícula de proteína, por ejemplo una subunidad de ferritina o una subunidad de lumazina sintasa, para generar una nanopartícula de proteína. Ejemplos específicos de antígenos de sitio mínimo Ø enlazados a una subunidad de nanopartícula de proteína se proporcionan en la presente en la Tabla 21.

En varias realizaciones, el antígeno PreF incluye una proteína de armazón de epítopo que incluye un epítopo específico de prefusión de proteína F de RSV en una conformación específica de prefusión. En algunos ejemplos, la proteína de armazón de epítopo incluye cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión como se describe en la presente. El epítopo específico de prefusión se puede colocar en cualquier parte de la proteína de armazón (por ejemplo en el extremo N, el extremo C o un bucle interno), siempre que el antígeno PreF que incluye la proteína de armazón de epítopo esté unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

Métodos para identificar y seleccionar armazones se describen en la presente y son conocidos para la persona de experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, los métodos para superposición, injerto y diseño de novo de armazones de epítopo se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2010/0068217.

La "superposición" de armazones de epítopo se basan en proteínas de armazón que tienen un segmento expuesto con conformación similar como el epítopo diana - los átomos de la cadena principal en esta "región de superposición" se pueden superponer estructuralmente sobre el epítopo diana con la desviación cuadrática media (RMSD) mínima de sus coordenadas. Armazones adecuados se identifican al buscar computacionalmente a través de una colección de estructuras de cristal de proteína; los armazones de epítopo se diseñan al poner los residuos de epítopo en la región de superposición y al hacer las mutaciones adicionales en la superficie circundante del armazón para prevenir la obstrucción u otras interacciones con el anticuerpo.

"Injerto" de estructuras de epítopo utilizan proteínas de armazón que pueden alojar el reemplazo de un segmento expuesto con la conformación cristalizada del epítopo diana. Para cada una de los armazones adecuados identificados por la búsqueda computacional a través de todas las estructuras cristalinas de la proteína, un segmento expuesto se reemplaza por el epítopo diana y las cadenas laterales circundantes se rediseñan (mutan) para alojar y estabilizar el epítopo insertado. Finalmente, como con la superposición de armazones de epítopo, las mutaciones se hacen en la superficie del armazón y fuera del epítopo, para prevenir la obstrucción u otras interacciones con el anticuerpo. El injerto de armazones requiere que el segmento reemplazado y el epítopo insertado tengan transformaciones de traducción y rotación similares entre sus extremos C y N, y que la cadena principal del péptido circundante no obstruya con el epítopo insertado. Una diferencia entre el injerto y la superposición es que el injerto intenta imitar la conformación del epítopo exactamente, mientras que la superposición permite desviaciones estructurales pequeñas.

Armazones de epítopo "de novo" se diseñan computacionalmente del rayado para presentar óptimamente la conformación cristalizada del epítopo. Este método se basa en un diseño computacional de un pliegue novedoso (Kuhlman, B. *et al.,* 2003 Science 302:1364-1368). El de novo permite el diseño de inmunógenos que son tanto mínimos en tamaño, de modo que no presentan epítopos indeseados, como altamente estables contra la desnaturalización térmica o química.

La estructura puede ser un armazón heterólogo. En varias realizaciones, la proteína de armazón nativa (sin inserción de epítopo) no es una proteína de envoltura viral. En realizaciones adicionales, la proteína de armazón no es una proteína de RSV. En todavía realizaciones adicionales, la proteína de armazón no es una proteína viral.

En realizaciones adicionales, la proteína de armazón de epítopo incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como una cualquiera de SEQ ID NOs: 341-343, o un polipéptido con por lo menos 80 % de identidad de secuencia (tal como por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % de identidad de secuencia) con una cualquiera de SEQ ID NOs: 341-343, y en donde la proteína de armazón de epítopo está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En realizaciones adicionales, la proteína F de RSV es una cualquiera de SEQ ID NOs: 341-343, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína F de RSV tiene hasta 20 sustituciones de aminoácido, y en donde la proteína de armazón de epítopo está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø), en la ausencia de la unión por el anticuerpo específico de prefusión correspondiente (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22). Alternativamente, el polipéptido puede tener ninguno, o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 sustituciones de aminoácido.

La proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión se puede colocar en cualquier parte en el armazón, siempre que la proteína de armazón de epítopo resultante esté unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluya una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø) en la ausencia de unión por el anticuerpo específico de prefusión correspondiente (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22). Métodos para determinar si una proteína de armazón de epítopo particular esté unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) se describen en la presente y son conocidos por una persona de experiencia ordinaria en la técnica (véanse, por ejemplo las Publicaciones de Solicitudes Internacionales Nºs WO 2006/091455 y WO 2005/111621). Además, la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno se puede ensayar utilizyo un cierto número de ensayos de diagnóstico bien definidos que incluyen formatos de inmunoensayo convencionales para detectar y/o cuantificar anticuerpos específicos de antígeno. Ensayos de este tipo incluyen, por ejemplo, inmunoensayos de enzimas, *p. ej.*, ELISA, ensayos a base de células, citometría de flujo, radioinmunoensayos y tinción inmunohistoquímica. Numerosos ensayos de unión de proteína competitivos y no competitivos son conocidos en la técnica y muchos están comercialmente disponibles. Métodos para determinar si una proteína de estructura de epítopo particular incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø), en la ausencia de la unión por el anticuerpo específico de prefusión correspondiente (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22) también se describen en la presente y, además, son conocidos por la persona de experiencia ordinaria en la técnica.

3. Partículas Similares a Virus

En algunas realizaciones, se proporciona una partícula similar a virus (VLP) que incluye una proteína F de RSV recombinante descrita estabilizada en una conformación de prefusión. Las VLPs carecen de los componentes virales que son requeridos para la replicación del virus y, por lo tanto, representan una forma altamente atenuada de un virus. La VLP puede exhibir un polipéptido (*p. ej.,* una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión) que es capaz de inducir una respuesta inmune a RSV cuyo se administra a un sujeto. Partículas similares a virus y métodos de su producción son conocidos por y son familiares para la persona de experiencia ordinaria en la técnica, y se conocen proteínas virales de varios virus que forman VLPs, incluyendo papilomavirus humano, HIV (Kang *et al.,* Biol. Chem. 380: 353-64 (1999)), virus de Semliki-Forest (Notka *et al.,* Biol. Chem. 380: 341-52 (1999)), poliomavirus humano (Goldmann *et al.,* J. Virol. 73: 4465-9 (1999)), rotavirus (Jiang *et al.,* Vaccine 17: 1005-13 (1999)), parvovirus (Casal, Biotechnology y Applied Biochemistry, Vol. 29, Parte 2, pp 141-150 (1999)), parvovirus canino (Hurtado *et al.*, J. Virol. 70: 5422-9 (1996)), virus de hepatitis E (Li *et al.*, J. Virol. 71: 7207-13 (1997)) y virus de la enfermedad de Newcastle. Por ejemplo, una VLP quimérica que contiene un antígeno de RSV y que puede ser una VLP a base de virus de la enfermedad de Newcastle. Las VLPs a base de la enfermedad de Newcastle han mostrado previamente inducir una respuesta inmune neutralizante al RSV en ratones. La formación de VLPs de este tipo se puede detectar mediante cualquier técnica adecuada. Ejemplos de técnicas adecuadas conocidas en la técnica para la detección de VLPs en un medio incluyen, *p. ej.,* las técnicas de microscopía electrónica, dispersión de luz dinámica (DLS), separación cromatográfica selectiva (*p. ej.,* intercambio iónico, interacción hidrofóbica y/o separación cromatográfica de exclusión por tamaño de las VLPs) y la centrifugación de gradiente de densidad.

En algunas realizaciones, la partícula similar a virus incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1 (tal como un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana), en donde el polipéptido F1 incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290 y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190; y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 207.

En algunas realizaciones, la partícula similar a virus incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1 (tal como un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana), en donde el polipéptido F1 incluye sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L y puede incluir, además, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190W y V207L, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190L y V207L, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207F, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190W y V207F, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190L y V207F, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207W, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190W y V207W o sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190L y V207W.

En algunas realizaciones, la partícula similar a virus incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1 (tal como un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana), en donde el polipéptido F2 y el polipéptido F1 incluyen las sustituciones de aminoácido expuestas como 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C y S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C, S290C y S190F) o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F). Las SEQ ID NOs: 374-376 no forman parte de la invención reivindicada.

En varias realizaciones, la partícula similar a virus incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 (tal como un polipéptido F1 enlazado a un dominio de transmembrana) y un polipéptido F_2 de un subtipo A de RSV humano, un subtipo B de RSV humano o un RSV bovino, en donde el polipéptido F1 incluye las modificaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L.

4. Nanopartículas de Proteína

En algunas realizaciones se proporciona una nanopartícula de proteína que incluye una o más de cualquiera de la proteína F de RSV recombinante descrita, estabilizada en una conformación de prefusión, en donde la nanopartícula de proteína está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Ejemplos no limitantes de nanopartículas incluyen nanopartículas de ferritina, nanopartículas de encapsulina y nanopartículas de azufre oxigenasa reductasa (SOR, por sus siglas en inglés), que están comprendidas de un ensamblaje de subunidades monoméricas que incluyen proteínas ferritina, proteínas encapsulina y proteínas SOR, respectivamente. Para construir nanopartículas de proteína que incluye la proteína F de RSV recombinante descrita, estabilizada en una conformación de prefusión, el antígeno está enlazado a una subunidad de la nanopartícula de proteína (tal como una proteína ferritina, una proteína encapsulina o una proteína SOR). La proteína de fusión se auto-ensambla en una nanopartícula bajo condiciones apropiadas.

Las nanopartículas de ferritina y su uso para fines de inmunización (p. ej., para la inmunización contra antígenos

de la influenza) se han descrito en la técnica (véase, p. ej., Kanekiyo et al., Nature, 499:102-106, 2013).

En algunas realizaciones, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión están enlazadas a un polipéptido de ferritina o híbrido de diferentes polipéptidos de ferritina para construir una nanopartícula de proteína ferritina, en donde la nanopartícula de ferritina está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). La ferritina es una proteína globular que se encuentra en todos los animales, bacterias y plantas, y que actúa principalmente para controlar la velocidad y ubicación de la formación de $Fe(III)_2O_3$ polinuclear a través del transporte de iones hierro hidratados y protones hacia y desde un núcleo mineralizado. La forma globular de la ferritina está constituida de subunidades monoméricas, que son polipéptidos que tienen un peso de molécula de aproximadamente 17-20 kDa. Un ejemplo de la secuencia de una subunidad monomérica de este tipo se representa por SEQ ID NO: 353. Cada una de las subunidades monoméricas tiene la topología de un haz de hélices que incluye un motivo de cuatro hélices antiparalelas, con una quinta hélice más corta (la hélice C-terminal) que se encuentra aproximadamente perpendicular al eje largo del haz de 4 hélices. De acuerdo con la convención, las hélices se marcan A, B, C, D y E desde el extremo N, respectivamente. La secuencia N-terminal se encuentra adyacente al eje de tres pliegues de la cápsida y se extiende a la superficie, mientras que las hélices E se empaquetan conjuntamente en el eje de cuatro pliegues con el extremo C que se extiende en el núcleo de la cápsida. La consecuencia de este empaquetamiento crea dos poros en la superficie de la cápsida. Se espera que uno o ambos de estos poros represente el punto mediante el cual el hierro hidratado se difunde dentro y fuera de la cápsida. Después de la producción, estas proteínas de subunidad monomérica se auto-ensamblan en la proteína ferritina globular. Por lo tanto, la forma globular de ferritina comprende 24 proteínas subunitarias monoméricas, y tiene una estructura similar a una cápsida que tiene simetría 432. Métodos para construir nanopartículas de ferritina son conocidos para la persona de experiencia ordinaria en la técnica y, además, se describen en la presente (véase, *p. ej.,* Zhang, *Int. J. Mol Sci.,* 12:5406-5421, 2011).

En ejemplos específicos, el polipéptido de ferritina es ferritina de *E. coli*, ferritina de *Helicobacter pylori*, ferritina de la cadena ligera humana, ferritina de rana de toro o un híbrido de la misma, tal como la ferritina híbrida de *E. coli*-humana, la ferritina híbrida de *E. coli*-rana de toro o la ferritina híbrida humana-rana de toro. Secuencias de aminoácidos ejemplares de polipéptidos de ferritina y secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ferritina para uso en los antígenos de proteína F de RSV descritos estabilizados en una conformación de prefusión se pueden encontrar en GENBANK®, por ejemplo en los números de acceso ZP_03085328, ZP_06990637, EJB64322.1, AAA35832, NP_000137 AAA49532, AAA49525, AAA49524 y AAA49523, disponibles desde el 28 de febrero de 2013. En una realización, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión está enlazada a una proteína ferritina que incluye una secuencia de aminoácidos por lo menos 80 % (tal como por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 97 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 353. Un ejemplo específico de las proteínas F de RSV recombinantes descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión, enlazadas a una proteína ferritina incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 350.

En algunas realizaciones, el polipéptido de ferritina es una ferritina de *Helicobacter pylori* (tal como un polipéptido de ferritina expuesto como SEQ ID NO: 353) e incluye una sustitución del residuo cisteína en la posición 31, tal como una sustitución C31S, C31A o C31V. Cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas (p. ej., un polipéptido F de RSV con sustituciones S155C, S290C y S190F o con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L) se puede enlazar a una ferritina de *Helicobacter pylori* (tal como un polipéptido de ferritina expuesto como SEQ ID NO: 353) que, además, incluye una sustitución del residuo cisteína en la posición 31 del polipéptido de ferritina, tal como una sustitución C31S, C31A o C31V.

En algunas realizaciones, la nanopartícula de proteína de ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a la proteína de ferritina, y en donde el polipéptido F1 incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190 y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 207.

En algunas realizaciones, la nanopartícula de proteína ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a la proteína ferritina, y en donde el polipéptido F1 incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L y puede incluir, además: sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207L, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207L, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207F, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190W y V207F, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190L y V207F, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207W, sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190W y V207W o sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190L y V207W.

La proteína F de RSV incluida en la nanopartícula de ferritina puede ser una proteína de subtipo A humano, subtipo B humano o F de RSV bovino que incluye las sustituciones descritas en la presente para la estabilización

de prefusión.

En algunas realizaciones, la nanopartícula de proteína ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a la proteína ferritina, y en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como las posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C y S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C, S290C y S190F); o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F). Las SEQ ID NOs: 374-376 no forman parte de la invención reivindicada.

En varias realizaciones, la nanopartícula de proteína ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F_1 y un polipéptido F_2 de un subtipo A de RSV humano, un subtipo B de RSV humano o un RSV bovino, en donde el polipéptido F1 incluye cualquiera de las modificaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L.

En algunas realizaciones la nanopartícula de ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a la proteína ferritina, y en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados a la proteína ferritina incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-679, respectivamente de SEQ ID NO: 377 (RSV A que incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F, V207L, con el dominio de ferritina C-terminal) o SEQ ID NOs: 378-382.

En algunas realizaciones, la nanopartícula de ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a ferritina, y en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados a ferritina incluyen las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F, V207L y cualesquiera sustituciones adicionales enumeradas en la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 de la columna 3 de la Tabla 8e. En algunas realizaciones, la nanopartícula de ferritina incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a la proteína ferritina, y en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados a la proteína ferritina incluyen la secuencia de aminoácidos del polipéptido F1 y F2 expuesto en la SEQ ID NO enumerada en la fila 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 de la columna 4 de la Tabla 8e. Se apreciará que las SEQ ID NOs. 602-617 y 620-634 y 645-650 enumeradas en la Tabla 8e incluyen la secuencia señal y las secuencias de polipéptido pep27, que se eliminan por procesamiento proteolítico cuyo la proteína F correspondiente se hace en células eucarióticas, así como etiquetas de proteína C-terminales.

Tabla 8e: Mutaciones de proteína F de RSV ejemplares y secuencias para la producción de nanopartículas de ferritina

Fila	Descripción	sustituciones /modificaciones	SEQ ID NO
1	Relleno de cavidad	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L230F	602
2	Relleno de cavidad	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L158F	603
3	Relleno de cavidad	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L230F/L158F	604
4	DSCav1 + reemplazos de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/	605
5	DSCav1 + reemplazos de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290C, S190F, V207L) + F477K/L481Q/V482K/L503Q/1506K	606
6	DSCav1 + reemplazos de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/F477K/L481Q/V482K/L503Q/1506K	607
7	Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L158F/L230F/L83F/V90F/I506K/I395F/V185F/T54A	608

8	Relleno de cavidad + reemplazo de residuos hidrófobos expuestos	(S155C, S290C, S190F, V207L) + L83F/V90F/1506K	609
9	DS-S190F con el anillo 1 Cys C-terminal	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, I515C	610
10	DS-S190F con el anillo 2 Cys C-terminal	S190F, S155C, S290C, F488W, L513C, A514E, G515E, 516C	611
11	DS-S190F con el anillo 3 Cys C-terminal	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514C	612
12	DS-S190F con el anillo 4 Cys C-terminal	S190F, S155C, S290C, F488W, L512C, L513E, A514E, G515C	613
13	DS-S190F con Foldon	S190F, S155C, S290C, F488W, Foldon	614
14	DS S190F con 1 puente disulfuro extra con Foldon Foldon	S190F, S155C, S290C, L171C, K191C, F488W, Foldon	615
15	DS S190F con 2 puentes disulfuro extra con Foldon	S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, Foldon	616
16	DS S190F con 3 puentes de disulfuro extra con Foldon	K77C, I217C, S190F, S155C, S290C, A424C, V450C, L171C, K191C, F488W, Foldon	617
17	Proteína F de cadena sencilla y acortada para terminar en el residuo 513	F de cadena sencilla con (S155C, S290C, S190F, V207L)	618
18	Proteína F de cadena sencilla y acortada para terminar en el residuo 492	F de cadena sencilla con (S155C, S290C, S190F, V207L)	619
19	Disulfuro	ferritina: S29C/C31S/V68C	620
20	Disulfuro	ferritina: C31S/A115C/H128C	621
21	Disulfuro + relleno de cavidad	L158F/L203F/V296I; Ferritina: S29C/C31S/V68C/A115C/H128C	622
22	Disulfuro + relleno de cavidad	Y198F/T219L/K226M; ferritina: C31S/A115C/H128C	623
23	Disulfuro + relleno de cavidad	E82V/K226M/N227L/V296I; ferritina: C31S/A115C/H128C	624
24	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción DYKDDDDKGG en N-terminal de F	625
25	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción QHHHHHHGG en extremo N de F	626
26	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción QHHHHHHHHGG en extremo N de F	627
27	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción GGHHHHHHGG en el residuo 327 de F	628
28	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción GGHHHHHHHHGG en el residuo 327 de F	629

29	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción HHHHH en el residuo 323 de F	630
30	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción QSAWSHPQFEKHHHHHHGGLVPRGSGG en extremo N de F	631
31	Purificación mejorada de partículas de Ferritina de DSCav1	(S155C, S290C, S190F, V207L) + e inserción QSAWSHPQFEKHHHHHHGGLVPRGSGG en extremo N de F	632
32	Enlazador más largo entre DSCav1 de F de RSV y Ferritina	(S155C, S290C, S190F, V207L) + enlazador de 10 aa a Ferritina	633
33	Enlazador más largo entre DSCav1 de F de RSV y Ferritina	(S155C, S290C, S190F, V207L) + N500Q + enlazador de 10 aa a Ferritina	634
34	extremo de cadena sencilla en el residuo 513, enlazador más largo	cadena sencilla de DS-Cav1 con enlazador más largo	635
35	extremo de una sola cadena en el residuo 492 enlazador más largo	cadena sencilla de DS-Cav1 con enlazador más largo	636
36	extremo de cadena sencilla en el residuo 513, N500Q elimina glicano	cadena sencilla de DS-Cav1 con N500Q	637
37	extremo de cadena sencilla en el residuo 513, enlazador más largo N500Q elimina glicano	cadena sencilla de DS-Cav1 con enlazador más largo N500Q	638
38	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla y Ferritina	S155C S290C, S190F, V207L cadena sencilla N105-G145 enlazan GS	639
39	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla y la Ferritina termina en 492	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q extremo de cadena sencilla en 492 N105-Gl45 enlazan GS	640
40	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla y Ferritina de enlazador más largo	S155C, S290C, S190F, V207L cadena sencilla N105-G145 + enlazador de 10 aa a Ferritina	641
41	Ds-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla y Ferritina termina en el enlazador más largo 492	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q extremo de cadena sencilla en 492 N105-G145 + enlazador 10 aa a Ferritina	642
42	DS-Cav1 de F RSV de una sola cadena y Ferritina y remueve N500 glicano	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q de cadena sencilla N105-G145 enlazan GS	643
43	DS-Cav1 de F RSV de cadena sencilla y Ferritina enlazador más largo y elimina N500 glicano	S155C, S290C, S190F, V207L, N500Q de cadena sencilla N105-G145 + enlazador de 10 aa a Ferritina	644
44	DS-Cav1 + hidrófobo expuesto + enlazador de 10 aa	DS-Cav1 + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/ + enlazador de 10 aa	645
45	DS-Cav1 + hidrófobo expuesto + enlazador de 10 aa	DS-Cav1 + F477K/L481Q/V482K/L503Q/1506K + enlazador de 10 aa	646
46	DS-Cav1 + hidrófobo expuesto + enlazador de 10 aa	DS-Cav1 + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/ F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K + enlazador de 10 aa	647
47	DS-Cav1 + hidrófobo expuesto + enlazador de 10 aa + eliminación de glicano N500	DS-Cav1 + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/ + enlazador de 10 aa +N500Q	648

48	DS-Cav1 + hidrófobo expuesto + enlazador de 10 aa + eliminación de glicano N500	DS-Cav1 + F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K + enlazador de 10 aa +N500Q	649
49	DS-Cav1 + hidrófobo expuesto + enlazador de 10 aa + eliminación de glicano N500	DS-Cav1 + L160K/V178T/L258K/V384T/I431S/L467Q/ F477K/L481Q/V482K/L503Q/I506K + enlazador de 10 aa +N500Q	650

En realizaciones adicionales, cualquiera de los antígenos de proteína F de RSV descritos estabilizados en una conformación de prefusión están enlazados a un polipéptido de encapsulina para construir una nanopartícula de encapsulina, en donde la nanopartícula de encapsulina está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Las proteínas encapsulina son una familia conservada de proteínas bacterianas también conocidas como proteínas similares a linocina que forman ensamblajes de proteína gryes que funcionan como un compartimiento mínimo para enzimas de paquete. El ensamblaje de encapsulina está constituido por subunidades monoméricas, que son polipéptidos que tienen un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Un ejemplo de la secuencia de una subunidad monomérica de este tipo se proporciona como SEQ ID NO: 354. Después de la producción, las subunidades monoméricas se auto-ensamblan en el ensamblaje de encapsulina globular que incluye 60 subunidades monoméricas. Métodos para construir nanopartículas de encapsulina son conocidos por la persona de experiencia ordinaria en la técnica y, además, se describen en la presente (véase, por ejemplo Sutter *et al.*, Nature Struct, y Mol. Biol., 15:939-947, 2008). En ejemplos específicos, el polipéptido de encapsulina es una encapsulina bacteriana, tal como la encapsulina de *E. coli* o *Thermotoga maritime*. Una secuencia de encapsulina ejemplar para uso con los antígenos de proteína F de RSV descritos, estabilizados en una conformación de prefusión, se expone como SEQ ID NO: 354.

En realizaciones adicionales, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión, están enlazadas a un polipéptido de azufre oxigenasa reductasa (SOR) para construir una nanopartícula de SOR, en donde la nanopartícula de SOR está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Las proteínas SOR son proteínas microbianas (por ejemplo el arqueón termoacidofílico *Acidianus ambivalens* que forma 24 ensamblajes de proteína subunitaria. Métodos para construir nanopartículas de SOR son conocidos para la persona de experiencia ordinaria en la técnica (véase, *p. ej.,* Urich *et al.,* Science, 311:996-1000, 2006). Ejemplos específicos de las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión enlazada a una proteína SOR incluyen las secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NO: 344 y SEQ ID NO: 345.

En realizaciones adicionales, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión, están enlazadas a un polipéptido de Lumazina sintasa para construir una nanopartículas de Lumazina sintasa, en donde la nanopartículas de Lumazina sintasa está enlazada específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Ejemplos específicos de las proteínas F de RSV recombinantes descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión, enlazadas a una proteína Lumazina sintasa incluyen las secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NOs: 346-348.

En realizaciones adicionales, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión están enlazadas a un polipéptido de piruvato deshidrogenasa para construir una nanopartícula de piruvato deshidrogenasa, en donde la nanopartícula de piruvato deshidrogenasa está unida específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). Un ejemplo específico de las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión enlazada a una proteína de piruvato deshidrogenasa incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 349.

En algunos ejemplos, cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión está enlazada al extremo N o C de una proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa, por ejemplo con un enlazador tal como un enlazador de Ser-Gly. Cuyo los construcciónes se han hecho en células HEK 293 Freestyle, las proteínas de fusión se secretan de las células y se auto-ensamblan en nanopartículas. Las nanopartículas se pueden purificar utilizyo técnicas conocidas, por ejemplo por unos pocos diferentes procedimientos de cromatografía, *p. ej.,* Mono Q (intercambio aniónico) seguido de la cromatografía de exclusión por tamaño (SUPEROSE® 6).

Varias realizaciones incluyen una subunidad monomérica de una proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa, o cualquier porción de la misma que sea capaz de dirigir el auto-ensamble de las subunidades monoméricas en la forma globular de la proteína. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades monoméricas de cualquier proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato

deshidrogenasa conocida se puede utilizar para producir proteínas de fusión con las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión, siempre que la subunidad monomérica sea capaz del auto-ensamblaje en una nanopartícula que exhibe las proteínas F de RSV recombinantes estabilizadas en una conformación de prefusión sobre su superficie.

Las proteínas de fusión no necesitan comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido de subunidad monomérica de una proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa. Las porciones, o regiones del polipéptido de subunidad monomérica se pueden utilizar siempre que la porción comprenda secuencias de aminoácidos que dirigen el auto-ensamblaje de las subunidades monoméricas en la forma globular de la proteína.

En algunas realizaciones, puede ser útil modificar por ingeniería genética mutaciones en la secuencia de aminoácidos de las subunidades monoméricas de ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa. Por ejemplo, puede ser útil alterar sitios tales como los sitios de reconocimiento de enzimas o los sitios de glicosilación con el fin de dar a la proteína de fusión las propiedades beneficiosas (*p. ej.,* semivida). Se entenderá por los expertos en la técnica que la fusión de cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión a la proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa se debe hacer de manera que las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una porción de conformación de prefusión de la proteína de fusión no interfiera con el auto-ensamblaje de las subunidades monoméricas de ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa en la proteína globular, y que la porción de proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa de la proteína de fusión no interfiera con capacidad del antígeno de proteína F de RSV recombinante descrita estabilizada en una conformación de prefusión para inducir una respuesta inmune a RSV. En algunas realizaciones, la proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa y la proteína F de RSV recombinante descrita, estabilizada en una conformación de prefusión, se puede unir conjuntamente de manera directa sin afectar a la actividad de cualquier porción. En otras realizaciones, la proteína ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa y la proteína F de RSV recombinante, estabilizada en una conformación de prefusión, se unen utilizyo una secuencia de enlazador (a la que también se alude como un espaciador). La secuencia de enlazador está diseñada para posicionar la porción de ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa de la proteína de fusión y la proteína F de RSV recombinante descrita estabilizada en una porción de conformación de prefusión de la proteína de fusión, con respecto entre sí, de modo que proteína de fusión mantiene la capacidad de ensamblarse en nanopartículas, y también inducir una respuesta inmune a RSV. En varias realizaciones, las secuencias de enlazador comprenden aminoácidos. Aminoácidos preferibles para el uso son los que tienen cadenas laterales pequeñas y/o los que no están cargados. Es menos probable que aminoácidos de este tipo interfirieran en el plegamiento apropiado y en la actividad de la proteína de fusión. Por consiguiente, los aminoácidos preferidos para el uso en secuencias de enlazador, ya sea solos o en combinación, son serina, glicina y alanina. Un ejemplo de una secuencia de enlazador de este tipo es SGG. Los aminoácidos se pueden añadir o substraer según sea necesario. Los expertos en la técnica son capaces de determinar secuencias de enlazador apropiadas para la construcción de nanopartículas de proteínas.

En determinadas realizaciones, las nanopartículas de proteína tienen un peso molecular de 100 a 5000 kDa, tal como aproximadamente 500 a 4600 kDa. En algunas realizaciones, una nanopartícula de Ferritina tiene un peso molecular aproximado de 650 kDa, una nanopartícula de Encapsulina tiene un peso molecular aproximado de 2100 kDa, una nanopartícula de SOR tiene un peso molecular aproximado de 1000 kDa, una nanopartícula de lumazina sintasa tiene un peso molecular aproximado de 4000 kDa y una nanopartícula de piruvato deshidrogenasa tiene un peso molecular aproximado de 4600 kDa, cuyo la nanopartícula de proteína incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión.

Las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión, enlazadas a las proteínas ferritina, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa pueden auto-ensamblarse en nanopartículas de proteína de multi-subunidades, denominadas nanopartículas de ferritina, nanopartículas de encapsulina, nanopartículas de SOR, nanopartículas de lumazina sintasa y nanopartículas de piruvato deshidrogenasa, respectivamente. Las nanopartículas incluyen las proteínas F de RSV recombinantes descritas, estabilizadas en una conformación de prefusión que tiene sustancialmente las mismas características estructurales que las nanopartículas de ferritina nativa, encapsulina, SOR, lumazina sintasa o piruvato deshidrogenasa que no incluyen las proteínas F de RSV recombinantes descritas estabilizadas en una conformación de prefusión. Es decir, contienen 24, 60, 24, 60 o 60 subunidades (respectivamente) y tienen una simetría correspondiente similar. En el caso de nanopartículas construidas de subunidades monoméricas que incluyen una proteína F de RSV recombinante descrita estabilizada en una conformación de prefusión, nanopartículas de este tipo están unidas específicamente por un anticuerpo específico de prefusión (*p. ej.,* anticuerpo D25 o AM22), y/o incluye una conformación específica de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø).

C. Polinucleótidos que Codifican Antígenos

También se proporcionan polinucleótidos que codifican los antígenos PreF descritos (*p. ej.,* una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión o proteína de armazón de epítopo o partícula similar a virus o nanopartículas de proteína que contiene proteínas de este tipo). Estos polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN que codifican el antígeno.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito, en donde el polipéptido F_0 precursor incluye, desde el extremo N al extremo C, un péptido señal, un polipéptido F_2, un polipéptido pep27 y un polipéptido F_1. En algunas realizaciones, el polipéptido pep27 incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 110-136 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, en donde las posiciones de aminoácido corresponden a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido F_0 de referencia expuesto como SEQ ID NO: 124. En algunas realizaciones, el péptido señal incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 1-25 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184 o 370, en donde las posiciones de aminoácido corresponden a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido F_0 de referencia expuesto como SEQ ID NO: 124.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito, en donde el polipéptido F_0 precursor incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como una cualquiera de SEQ ID NOs: 185, o 189-303. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito, en donde el polipéptido F_0 precursor incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como residuos 1-513 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 185 o 189-303.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito que incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, y en donde el polipéptido F1 incluye un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190; o un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en las posiciones 155 y 290, una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 190 y una sustitución de aminoácido de relleno de cavidad en la posición 207.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito que incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, y en donde el polipéptido F1 incluye las sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207L y puede incluir, además, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207L, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207L, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207F, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207F, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207F, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190F y V207W, sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190W y V207W o sustituciones de aminoácido S155C, S290C, S190L y V207W.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito que incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 incluyen la secuencia de aminoácido expuesta como posiciones 26-109 y 137-513, respectivamente, de una cualquiera de SEQ ID NO: 371 (RSV A con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 372 (RSV B con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 373 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), SEQ ID NO: 374 (RSV A con sustituciones S155C, S290C y S190F), SEQ ID NO: 375 (RSV B con sustituciones S155C, S290C y S190F); o SEQ ID NO: 376 (RSV bovino con sustituciones S155C, S290C y S190F). Las SEQ ID NOs: 374-376 no forman parte de la invención reivindicada.

En varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito que incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1 de un subtipo A de RSV humano, un subtipo B de RSV humano o un RSV bovino, en donde el polipéptido F1 incluye las modificaciones estabilizantes S155C, S290C, S190F y V207L.

En un ejemplo no limitante, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F_0 precursor que, cuyo se expresa en una célula apropiada, se procesa en un antígeno PreF descrito que incluye una proteína F de RSV recombinante que incluye un polipéptido F2 y un polipéptido F1, en donde el polipéptido F1 está enlazado a una proteína ferritina, y en donde el polipéptido F_2 y el polipéptido F_1 enlazados a la proteína ferritina incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como posiciones 26-109 y 137-679, respectivamente, de SEQ ID NO: 377 (RSV A que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, con dominio de ferritina C-terminal) o SEQ ID NOs: 378-382.

En un ejemplo no limitante, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 383 (proteína F de RSV del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensados a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y StrepTag II).

En otro ejemplo no limitante, la molécula de ácido nucleico es un vector de expresión, e incluye la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 384 (proteína F de RSV del subtipo A humano que incluye las sustituciones de aminoácidos S155C, S290C, S190F y V207L, condensada a un dominio Foldon C-terminal, sitio de escisión de trombina, etiqueta 6xHis y un StrepTag II).

Métodos para la manipulación e inserción de los ácidos nucleicos de esta divulgación en vectores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual,* 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 y Ausubel *et al., Current Protocols in Molecular Biology,* Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1994).

Un ácido nucleico que codifica antígenos PreF (*p. ej.,* una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, o proteína de armazón de epítopo, o partícula similar a virus o nanopartícula de proteína que contiene proteínas de este tipo) se puede clonar o amplificar por métodos *in vitro*, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia auto-sostenido (3SR) y el sistema de amplificación de replicasa Qβ (QB). Por ejemplo, un polinucleótido que codifica la proteína se puede aislar mediante la reacción en cadena de la polimerasa de ADNc utilizyo cebadores en base a la secuencia de ADN de la molécula. Una amplia variedad de metodologías de clonación y amplificación *in vitro* son bien conocidas para las personas expertas en la técnica. Los métodos de PCR se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nº 4,683,195; Mullis *et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263, 1987; y Erlich, ed., *PCR Technology,* (Stockton Press, NY, 1989). Los polinucleótidos también se pueden aislar al clasificar genotecas o colecciones de ADNc con sondas seleccionadas de las secuencias del polinucleótido deseado bajo condiciones de hibridación rigurosas.

Los polinucleótidos que codifican antígenos PreF (*p. ej.,* una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, o proteína de armazón de epítopo, o partícula similar a virus o nanopartícula de proteína que contiene proteínas de este tipo) incluyen un ADN recombinante que se incorpora en un vector en un plásmido autónomamente replicante o virus o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (tal como un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquier nucleótido. El término incluye formas sencillas y dobles de ADN.

Secuencias de ADN que codifican antígenos PreF (*p. ej.,* una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, o proteína de armazón de epítopo, o partícula similar a virus o nanopartícula de proteína que contiene proteínas de este tipo) se puede expresar *in vitro* mediante la transferencia de ADN en una célula huésped adecuada. La célula puede ser procariótica o eucariótica. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped objeto. Se entiende que toda la progenie no puede ser idéntica a la célula parental, puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Métodos de transferencia estable, lo que significa que el ADN extraño se mantiene continuamente en el huésped, son conocidos en la técnica.

Secuencias de polinucleótido que codifican antígenos PreF (*p. ej.,* una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, o proteína de armazón de epítopo, o partícula similar a virus o nanopartícula de proteína que contiene proteínas de este tipo) se pueden enlazar operativamente a las secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de la expresión operativamente enlazada a una secuencia codificante se liga de manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no están limitada a promotores apropiados, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (*es decir,* ATG) en el frente de un gen que codifica proteína, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción apropiada de ARNm, y codones de parada.

Los huéspedes pueden incluir organismos microbianos, de levadura, de insectos y de mamíferos. Métodos para expresar secuencias de ADN que tienen secuencias eucarióticas o virales en procariotas son bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas incluyen bacterias, arqueas, insectos, hongos (por ejemplo levaduras), células vegetales y animales (por ejemplo, célula de mamífero, tal como ser humano). Células ejemplares de uso incluyen *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Salmonella typhimurium,* células SF9, células C129, células 293, *Neurospora* y líneas de células mieloides y linfoides de mamífero inmortalizadas. Técnicas para la propagación de células de mamífero en cultivo son bien conocidas (véase Jakoby y Pastan (eds), 1979, Cell Culture. Methods in Enzymology, volumen 58, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, N.Y.). Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero comúnmente utilizadas

son las células VERO y HeLa, células CHO y líneas de células WI38, BHK y COS, aunque se pueden utilizar líneas celulares, tales como células diseñadas para proporcionar una expresión más alta, patrones de glicosilación deseables u otras características. En algunas realizaciones, las células huésped incluyen células HEK293 o derivados de las mismas, tales como células $GnTI^{-/-}$ (ATCC® Nº CRL-3022).

La transformación de una célula huésped con el ADN recombinante se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales como son bien conocidas para los expertos en la técnica. En los casos en los que el huésped es procariótico, tal como, pero no limitado a células competentes de *E. coli* que son capaces de la captación de ADN se pueden preparar a partir de células recolectadas de la fase de crecimiento exponencial y posteriormente se pueden tratar por el método de $CaCl_2$ utilizyo procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede utilizar $MgCl_2$ o RbCl. La transformación también se puede realizar después de formar un protoplasto de la célula huésped si se desea o mediante electroporación.

Cuyo el huésped es un eucariota, métodos de transfección de ADN como coprecipitados de fosfato de calcio de este tipo, se pueden utilizar procedimientos mecánicos convencionales tales como la microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas o vectores virales. Las células eucarióticas también se pueden co-transformar con secuencias de polinucleótidos que codifican un antígeno descrito, y una segunda molécula de ADN extraña que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de timidina quinasa de herpes simplex. Otro método es utilizar un vector viral eucariótico, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus de papiloma bovino, para infectar transitoriamente o transformar las células eucarióticas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, *Eukaryotic Viral Vectors,* Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

D. Vectores Virales

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión se pueden incluir en un vector viral, por ejemplo para la expresión del antígeno en una célula huésped, o para la inmunización de un sujeto como se describe en la presente. En algunas realizaciones, los vectores virales se administran a un sujeto como parte de una vacunación de refuerzo. En varias realizaciones, los vectores virales se incluyen en una vacuna, tal como una vacuna de cebador o una vacuna de refuerzo para el uso en la vacunación de cebador-refuerzo.

En varios ejemplos, el vector viral que codifica la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión puede ser competente de replicación. Por ejemplo, el vector viral puede tener una mutación (*p. ej.,* inserción de ácido nucleico que codifica el antígeno PreF) en el genoma viral que no inhibe la replicación viral en células huésped. El vector viral también puede ser condicionalmente competente de replicación. En otros ejemplos, el vector viral es deficiente de replicación en células huésped.

En varias realizaciones, la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión se expresa por un vector viral que se puede suministrar a través del tracto respiratorio. Por ejemplo, un vector de paramixovirus (PIV) tal como el vector de virus de parainfluenza bovina (BPIV) (*p. ej.,* un vector BPIV-1, BPIV-2 o BPV-3) o el vector de PIV humano, un vector de metapneumovirus (MPV), vector de virus Sendia o un vector de virus de las paperas, se utiliza para expresar un antígeno descrito. Un vector viral BPIV3 que expresa las proteínas F de RSV y F de hPIV (MEDI-534) está actualmente en ensayos clínicos como una vacuna de RSV. Ejemplos del vector paramixovirus (PIV) para expresar antígenos son conocidos por la persona de experiencia en la técnica (véanse, *p. ej.,* las Publicaciones de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos 2012/0045471, 2011/0212488, 2010/0297730, 2010/0278813, 2010/0167270, 2010/0119547, 2009/0263883, 2009/0017517, 2009/0004722, 2008/0096263, 2006/0216700, 2005/0147623, 2005/0142148, 2005/0019891, 2004/0208895, 2004/0005545, 2003/0232061, 2003/0095987 y 2003/0072773). En otro ejemplo, un vector viral de la enfermedad de Newcastle se utiliza para expresar un antígeno descrito (véase, *p. ej.,* McGinnes *et al.*, *J. Virol,* 85:366-377, 2011, que describe proteínas F y G de RSV expresadas en partículas similares a la enfermedad de Newcastle). En otro ejemplo, se utiliza un vector de virus Sendai para expresar un antigeno descrito (véase, *p. ej.,* Jones *et al., Vaccine,* 30:959-968, 2012, que describe el uso de una vacuna de RSV a base del virus Sendai para inducir una respuesta inmune en primates).

También están disponibles vectores virales adicionales para la expresión de los antígenos descritos, incluyendo polioma, *es decir,* SV40 (Madzak *et al.,* 1992, *J. Gen. Virol.,* 73:15331536), adenovirus (Berkner, 1992, *Cur. Top. Microbiol. Immunol.,* 158:39-6; Berliner *et al.,* 1988, *Bio Techniques,* 6:616 a 629; Gorziglia *et al.,* 1992, *J. Virol.,* 66:4407-4.412; Quantin *et al.,* 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89:2581-2584; Rosenfeld *et al.,* 1992, *Cell,* 68:143-155; Wilkinson *et al.,* 1992, *Nucl. Acids Res.,* 20:2233-2239; Stratford-Perricaudet *et al.,* 1990, *Hum. Gene Ther.,* 1:241-256), virus vaccinia (Mackett *et al.,* 1992, *Biotechnology,* 24:495-499), virus adeno-asociado (Muzyczka, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 158:91-123; On *et al.,* 1990, *Gene,* 89:279-282), virus de herpes que incluyen HSV y EBV y CMV (Margolskee, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 158:67-90; Johnson *et al.,* 1992, *J. Virol.,* 66:29522965; Fink *et al.,* 1992, *Hum. Gene. Ther.* 3:11-19; Breakfield *et al.,* 1987, *Mol. Neurobiol.,* 1:337-371; Fresse *et al.,* 1990, *Biochem. Pharmacol.,* 40:2189-2199), virus Sindbis (H. Herweijer *et al.,* 1995, *Human Gene Therapy* 6:1161-1167; Patentes de los Estados Unidos Nºs 5,091,309 y 5,217,879), alfavirus (S. Schlesinger, 1993, *Trends Biotechnol.* 11:18-22; I. Frolov *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

93:11371-11377) y retrovirus de aves (Bryyopadhyay *et al.*, 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:749-754; Petropouplos *et al.*, 1992, *J. Virol.*, 66:3.391-3397), murino (Miller, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol,* 158: 1-24; Miller *et al.*, 1985, *Mol. Cell Biol,* 5:431-437; Sorge *et al.*, 1984, *Mol. Cell Biol,* 4:1730-1737; Mann *et al.*, 1985, *J. Virol.*, 54:401-407) y de origen humano (Page *et al.*, 1990, *J. Virol.*, 64:5370-5276; Buchschalcher *et al.*, 1992, *J. Virol.*, 66:2731-2739). Los vectores de Baculovirus (virus polihedrosis multinuclear de Autographa californica; AcMNPV) también son conocidos en la técnica, y se pueden obtener de fuentes comerciales (tales como PharMingen, San Diego, Calif.; Protein Sciences Corp., Meriden, Conn.; Stratagene, La Jolla, Calif.). Vectores virales adicionales son familiares para la persona de experiencia ordinaria en la técnica.

En varias realizaciones, los métodos y las composiciones descritos en la presente incluyen un vector adenoviral que expresa una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión. Adenovirus de diversos orígenes, subtipos o mezcla de subtipos se pueden utilizar como la fuente del genoma viral para el vector adenoviral. Adenovirus no humanos (*p. ej.,* adenovirus de simio, chimpancé, gorila, ave, caninos, ovinos o bovinos) se pueden utilizar para generar el vector adenoviral. Por ejemplo, un adenovirus de simio se puede utilizar como la fuente del genoma viral del vector adenoviral. Un adenovirus de simio puede ser del serotipo 1, 3, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 27, 33, 38, 39, 48, 49, 50 o cualquier otro serotipo adenoviral de simio. A un adenovirus de simio se le puede aludir al utilizar cualquier abreviatura adecuada conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, SV, SAdV, SAV o sAV. En algunos ejemplos, un vector adenoviral de simio es un vector adenoviral de simio del serotipo 3, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 27, 33, 38 o 39. En un ejemplo, se utiliza un vector Ad3 del serotipo C de chimpancé (véase, *p. ej.,* Peruzzi *et al.*, Vaccine, 27:1293-1300, 2009). El adenovirus humano se puede utilizar como la fuente del genoma viral para el vector adenoviral. El adenovirus humano puede ser de diversos subgrupos o serotipos. Por ejemplo, un adenovirus puede ser del subgrupo A (*p. ej.,* serotipos 12, 18 y 31), subgrupo B (*p. ej.*, serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35 y 50), subgrupo C (*p. ej.,* serotipos 1, 2, 5 y 6), subgrupo D (*p. ej.,* serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36-39 y 42-48), subgrupo E (*p. ej.,* serotipo 4), subgrupo F (*p. ej.,* serotipos 40 y 41), un serotipo no clasificado (*p. ej.,* serotipos 49 y 51) o cualquier otro serotipo adenoviral. La persona de experiencia ordinaria en la técnica está familiarizada con los vectores adenovirales competentes y deficientes de replicación (incluyendo vectores adenovirales deficientes de replicación individual y múltiple). Ejemplos de vectores adenovirales deficientes de replicación, incluyendo los vectores adenovirales deficientes de replicación múltiple se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nºs 5,837,511; 5,851,806; 5,994,106; 6,127,175; 6,482,616; y 7,195,896, y las Solicitudes de Patentes Internacionales Nºs WO 94/28152, WO 95/02697, WO 95/16772, WO 95/34671, WO 96/22378, WO 97/12986, WO 97/21826, WO 03/02231 1.

E. Composiciones

Los antígenos PreF, los vectores virales y las moléculas de ácido nucleico descritos se pueden incluir en una composición farmacéutica, que incluye formulaciones terapéuticas y profilácticas, y se pueden combinar junto con uno o más adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos, tales como fármacos antivirales. En varias realizaciones, las composiciones que incluyen uno o más de los antígenos PreF, vectores virales o las moléculas de ácido nucleico descritos son composiciones inmunogénicas. La composición puede incluir cualquiera de los antígenos PreF que incluyen una proteína F de RSV recombinante como se describe en la presente, (tal como una nanopartícula de proteína que incluye cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes como se describe en la presente), una partícula similar a virus que incluye cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes como se describe en la presente, una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes como se describe en la presente, o un vector que codifica o que incluye cualquiera de las proteínas F de RSV recombinantes como se describe en la presente.

En algunas realizaciones, la composición incluye un primer antígeno aislado que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV de subtipo A, y un segundo antígeno aislado que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

En algunas realizaciones, la composición incluye una primera nanopartícula de proteína que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo A, y una segunda nanopartícula de proteína que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

En algunas realizaciones, la composición incluye un primer vector viral que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo A, y un

segundo vector viral que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

En algunas realizaciones, la composición incluye una primera partícula similar a virus que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo A, y una segunda partícula similar a virus que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

En algunas realizaciones, la composición incluye una primera molécula de ácido nucleico (tal como un vector de expresión) que codifica una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en la proteína F de RSV del subtipo A, y una segunda molécula de ácido nucleico (tal como un vector de expresión) que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tal como las sustituciones S155C, S290C y S190F o las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

Composiciones farmacéuticas de este tipo se pueden administrar a los sujetos mediante una diversidad de modos de administración conocidos por la persona de experiencia ordinaria en la técnica, por ejemplo, vías nasales, pulmonares, intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales o parenterales.

Para formular las composiciones, los antígenos PreF, vectores virales o moléculas de ácido nucleico descritos se pueden combinar con diversos aditivos farmacéuticamente aceptables, así como una base o vehículo para dispersión del conjugado. Aditivos deseados incluyen, pero no están limitados a agentes de control del pH, tales como arginina, hidróxido de sodio, glicina, ácido clorhídrico, ácido cítrico, y similares. Además, se pueden incluir anestésicos locales (por ejemplo, alcohol bencílico), agentes isotonizantes (por ejemplo, cloruro sódico, manitol, sorbitol), inhibidores de la adsorción (por ejemplo, TWEEN® 80), agentes potenciadores de la solubilidad (por ejemplo, ciclodextrinas y derivados de las mismas), estabilizadores (por ejemplo, albúmina sérica) y agentes reductores (por ejemplo, glutationa). Adyuvantes, tal como hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL®, disponible de Brenntag Biosector, Copenhague, Dinamarca y AMPHOGEL®, Wyeth Laboratories, Madison, NJ), adyuvante de Freund, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, IN), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA), agonistas de TLR (tales como agonistas de TLR-9), entre muchos otros adyuvantes adecuados bien conocidos en la técnica, se pueden incluir en las composiciones.

Cuyo la composición es un líquido, la tonicidad de la formulación, como se mide con referencia a la tonicidad de la solución salina fisiológica al 0.9 % (p/v) tomada como unidad, se ajusta típicamente a un valor en el cual no se inducirá un daño sustancial irreversible al tejido en el sitio de administración. Generalmente, la tonicidad de la solución se ajusta a un valor de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 3.0, tal como aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.0 o aproximadamente 0.8 a aproximadamente 1.7.

Los antígenos PreF, vectores virales o moléculas de ácido nucleico descritos se pueden dispersar en una base o vehículo, que puede incluir un compuesto hidrófilo que tiene una capacidad para dispersar a los antígenos, y cualquiera de los aditivos deseados. La base se puede seleccionar de una amplia gama de compuestos adecuados, que incluyen pero no se limitan a copolímeros de ácidos policarboxílicos o sales de los mismos, anhídridos carboxílicos (por ejemplo, anhídrido maleico) con otros monómeros (por ejemplo, (met)acrilato de metilo, ácido acrílico y similares), polímeros de vinilo hidrófilos, tales como poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, derivados de celulosa, tales como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares, y polímeros naturales, tales como quitosán, colágeno, alginato de sodio, gelatina, ácido hialurónico y sales de metales no tóxicas de los mismos. Frecuentemente, un polímero biodegradable se selecciona como una base o un vehículo, por ejemplo, ácido poliláctico, copolímero de poli(ácido láctico-ácido glicólico), ácido polihidroxibutírico, copolímero de poli(ácido hidroxibutírico-ácido glicólico) y mezclas de los mismos. Alternativa o adicionalmente, ésteres de ácido graso sintéticos tales como ésteres de ácido graso de poliglicerol, ésteres de ácido graso de sacarosa y similares se pueden emplear como vehículos. Los polímeros hidrófilos y otros vehículos se pueden utilizar solos o en combinación, y la integridad estructural aumentada se puede impartir al vehículo mediante la cristalización parcial, enlace iónico, reticulación y similares. El vehículo se puede proporcionar en una diversidad de formas, incluyendo soluciones fluidas o viscosas, geles, pastas, polvos, microesferas y películas, por ejemplo para aplicación directa a una superficie de la mucosa.

Los antígenos PreF descritos, vectores virales o moléculas de ácido nucleico se pueden combinar con la base o el vehículo de acuerdo con una diversidad de métodos, y la liberación de los antígenos puede ser mediante difusión, desintegración del vehículo o la formación asociada de canales de agua. En algunas circunstancias, los

antígenos descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, que expresa o que incluye el antígeno, se dispersa en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas) preparadas a partir de un polímero adecuado, por ejemplo, 2-cianoacrilato de isobutilo (véase, por ejemplo Michael *et al., J. Pharmacy Pharmacol.* 43:1-5, 1991), y se dispersa en un medio dispersante biocompatible que produce el suministro sostenido y la actividad biológica durante un tiempo prolongado.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener como vehículos farmacéuticamente aceptables sustancias según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores y tamponadores del pH, agentes ajustadores de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán y oleato de trietanolamina. Para composiciones sólidas, vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

Composiciones farmacéuticas para administración de los antígenos PreF, vectores virales o moléculas de ácido nucleico descritos también se pueden formular como una solución, microemulsión u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de ingredientes activos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y los similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada para las soluciones se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula deseado en el caso de formulaciones dispersables, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de los antígenos descritos se puede originar al incluir en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En determinad realizaciones, los antígenos PreF, vectores virales o moléculas de ácido nucleico descritos se pueden administrar en una formulación de liberación con el tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Estas composiciones se pueden preparar con vehículos que protegerán frente a una liberación rápida, por ejemplo un vehículo de liberación controlada tal como un polímero, sistema de suministro microencapsulado o gel bioadhesivo. El suministro prolongado en diversas composiciones de la divulgación se puede originar al incluir en la composición agentes que retardan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina. Cuyo se desean formulaciones de liberación controlada, aglutinantes de liberación controlada adecuados para uso de acuerdo con la divulgación incluyen cualquier material de liberación controlada biocompatible que es inerte al agente activo y que es capaz de incorporar el antígeno descrito y/u otro agente biológicamente activo. Numerosos materiales de este tipo son conocidos en la técnica. Aglutinantes de liberación controlada útiles son materiales que se metabolizan lentamente bajo condiciones fisiológicas después de su suministro (por ejemplo, en una superficie de la mucosa, o en presencia de fluidos corporales). Aglutinantes apropiados incluyen, pero no están limitados a polímeros y copolímeros biocompatibles bien conocidos en la técnica para uso en formulaciones de liberación sostenida. Compuestos biocompatibles de este tipo son no tóxicos e inertes a los tejidos circundantes, y no activan efectos secundarios adversos significativos, tales como irritación nasal, respuesta inmune, inflamación o similares. Se metabolizan en productos metabólicos que también son biocompatibles y fácilmente eliminados del cuerpo. Se conocen numerosos sistemas para el suministro controlado de proteínas terapéuticas (*p. ej.,* Patente de los Estados Unidos Nº 5,055,303; Patente de los Estados Unidos Nº 5,188,837; Patente de los Estados Unidos Nº 4,235,871; Patente de los Estados Unidos Nº 4,501,728; Patente de los Estados Unidos Nº 4,837,028; Patente de los Estados Unidos Nº 4,957,735; y Patente de los Estados Unidos Nº 5,019,369; Patente de los Estados Unidos Nº 5,055,303; Patente de los Estados Unidos Nº 5,514,670; Patente de los Estados Unidos Nº 5,413,797; Patente de los Estados Unidos Nº 5,268,164; Patente de los Estados Unidos Nº 5,004,697; Patente de los Estados Unidos Nº 4,902,505; Patente de los Estados Unidos Nº 5,506,206; Patente de los Estados Unidos Nº 5,271,961; Patente de los Estados Unidos Nº 5,254,342; y Patente de los Estados Unidos Nº 5,534,496).

Materiales poliméricos ejemplares para uso incluyen, pero no están limitados a matrices poliméricas derivadas de poliésteres copoliméricos y homopoliméricos que tienen enlaces de éster hidrolizables. Un cierto número de estos son conocidos en la técnica que son biodegradables y que conducen a productos de degradación que no tienen o son de baja toxicidad. Polímeros ejemplares incluyen ácidos poliglicólicos y ácidos polilácticos, poli(DL-ácido láctico-co-ácido glicólico), poli(D-ácido láctico-co-ácido glicólico) y poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). Otros polímeros biodegradables o bioerosionables útiles incluyen, pero no están limitados a polímeros tales como poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido beta-hidroxi butírico), poli(2-cianoacrilato de alquilo), hidrogeles, tales como poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas, poli(aminoácidos) (por ejemplo, L-leucina, ácido glutámico, ácido L-aspártico y similares), poli(éster urea), poli(2-hidroxietil-DL-aspartamida), polímeros de poliacetal, poliortoésteres, policarbonato, polimaleamidas, polisacáridos y copolímeros de los mismos. Muchos métodos para preparar formulaciones de este tipo son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo *Sustained y Controlled Release Drug Delivery Systems,* J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978). Otras

formulaciones útiles incluyen microcápsulas de liberación controlada (Patentes de los Estados Unidos Nºs 4,652,441 y 4,917,893), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico útiles en la elaboración de microcápsulas y otras formulaciones (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,677,191 y 4,728,721) y composiciones de liberación sostenida para péptidos hidrosolubles (Patente de los Estados Unidos Nº 4,675,189).

Las composiciones farmacéuticas son típicamente estériles y estables bajo las condiciones de fabricación, almacenamiento y uso. Las soluciones estériles se pueden preparar al incorporar los antígenos PreF, vectores virales o moléculas de ácido nucleico descritos en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados en la presente, según se requiera, seguido de la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el antígeno descrito y/u otro agente biológicamente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en la presente. En el caso de polvos estériles, los métodos de preparación incluyen el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del antígeno descrito más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada estéril de la misma. La prevención de la acción de los microorganismos se puede realizar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

Métodos actuales para preparar composiciones administrables son bien conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como *Remingtons Pharmaceutical Sciences,* 19ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1995.

En varias realizaciones, las composiciones incluyen un adyuvante. La persona de experiencia ordinaria en la técnica está familiarizada con adyuvantes, por ejemplo, los que se pueden incluir en una composición inmunogénica. En varias realizaciones, el adyuvante se selecciona para inducir una respuesta inmune desviada de Th1 en un sujeto al que se ha administrado una composición inmunogénica que contiene el adyuvante y un antígeno descrito, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno.

Un adyuvante adecuado es un derivado de lipopolisacárido bacteriano no tóxico. Un ejemplo de un derivado no tóxico adecuado del lípido A es monofosforil lípido A o monofosforil lípido A más particularmente 3-desacilado (3D-MPL). Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nºs 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094. 3D-MPL principalmente fomenta las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-γ (Th1). 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los métodos descritos en el documento GB2220211 A. Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En las composiciones se puede utilizar 3D-MPL de partícula pequeña. 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar en condiciones estériles a través de un filtro de 0.22 μm. Preparaciones de este tipo se describen en el documento WO 94/21292.

En otras realizaciones, el lipopolisacárido puede ser un disacárido de P(1-6) glucosamina, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 6,005,099 y la Patente EP Nº 0 729 473 B1. Una persona de experiencia en la técnica sería fácilmente capaz de producir diversos lipopolisacáridos, tal como 3D-MPL, en base a las enseñanzas de estas referencias. Además de los inmunoestimulantes antes mencionados (que son similares en estructura a la de LPS o MPL o 3D-MPL), el monosacárido acilado y derivados de disacárido que son una sub-porción a la estructura anterior de MPL también son adyuvantes adecuados.

En varias realizaciones, un agonista de receptor similar a Toll (TLR) se utiliza como adyuvante. Por ejemplo un antígeno PreF descrito se puede combinar con un agonista de TLR en una composición inmunogénica utilizada para la inducción de una respuesta inmune neutralizante a RSV. Por ejemplo, el agonista de TLR puede ser un agonista de TLR-4, tal como un derivado sintético de lípido A (véanse, *p. ej.,* los documentos WO 95/14026 y WO 01/46127) un fosfato de glucosaminida de alquilo (AGP; véase, *p. ej.,* el documento WO 98/50399 o las Patentes de los Estados Unidos Nºs 6,303,347; 6,764,840). Otros ligyos de TLR-4 adecuados, capaces de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-4 son, por ejemplo, lipopolisacárido de bacterias gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: la proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; Proteína A de tensioactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y P-defensina-2 y muramil dipéptido (MDP). En una realización, el agonista de TLR es HSP 60, 70 o 90. Otros ligyos de TLR-4 adecuados son como se describe en el documento WO 2003/011223 y en el documento WO 2003/099195.

Agonistas de TLR adicionales (tal como un agente que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de una vía de señalización de TLR) también son útiles como adyuvantes, tales como agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y/o TLR9. Por consiguiente, en una realización, la composición incluye, además, un adyuvante que se selecciona del grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, un agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, un agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, un agonista de TLR-9, o una combinación de los mismos.

En una realización, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a

través de TLR-1, por ejemplo uno o más de: lipopéptidos tri-acilados (LPs); modulina soluble en fenol; Micobacterium tuberculosis LP; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)--OH, trihidrocloruro (Pam3Cys) LP que imita el extremo amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y LP de OspA de Borrelia burgdorferi. En otra realización, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-2, tal como uno o más de una lipoproteína, un peptidoglicano, un lipopéptido bacteriano de M tuberculosis, B burgdorferi o T pallidum; peptidoglicanos de especies que incluyen Staphylococcus aureus; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de Neisseria, fimbriae bacterianas, factores de virulencia de Yersina, viriones de CMV, hemaglutinina del sarampión y zymosan de levadura. En algunas realizaciones, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-3, tal como uno o más de ARN de doble cadena (ARNdc), o ácido poli-inosínico-policitidílico (Poli IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado con infección viral. En realizaciones adicionales, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-5, tal como flagelina bacteriana. En realizaciones adicionales, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-6, tal como una o más de lipoproteína micobacteria, LP-di-acilado, modulina soluble en fenol. Agonistas de TLR6 adicionales se describen en el documento WO 2003/043572. En una realización, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-7, tal como uno o más de un ARN de cadena sencilla (ARNcs), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8 o un compuesto de imidazoquinolina o derivado del mismo. En una realización, el agonista de TLR es imiquimod. Agonistas de TLR7 adicionales se describen en el documento WO 2002/085905. En algunas realizaciones, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-8. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-8 es un ARN de cadena sencilla (ARNcs), una molécula de imidazoquinolina con actividad anti-viral, por ejemplo resiquimod (R848); resiquimod también es capaz del reconocimiento por parte de TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que se pueden utilizar incluyen los descritos en el documento WO 2004/071459.

En realizaciones adicionales, un adyuvante incluye un agonista de TLR capaz de inducir una respuesta de señalización a través de TLR-9. Por ejemplo, el adyuvante puede incluir HSP90, ADN bacteriano o viral y/o ADN que contiene nucleótidos CpG no metilados (*p. ej.,* un oligonucleótido CpG). Por ejemplo, los oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta predominantemente de Th1. Oligonucleótidos de este tipo son bien conocidos y se describen, por ejemplo en los documentos WO 95/26204, WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes de los Estados Unidos Nºs 5,278,302, 5,666,153 y 6,008,200 y 5,856,462. Por consiguiente, los oligonucleótidos para uso como adyuvantes en las composiciones descritas incluyen oligonucleótidos que contienen CpG, por ejemplo, que contienen dos o más motivos CpG de dinucleótido. También se incluyen oligonucleótidos con enlaces internucleótido mixtos.

Otros adyuvantes que se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas con los antígenos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye un antígeno, *p. ej.,* por sí mismo o en combinación con 3D-MPL, u otro adyuvante descrito en la presente, son saponinas, tal como QS21. En algunos ejemplos, las saponinas se utilizan como un adyuvante, *p. ej.,* para la administración sistémica de un antígeno PreF. El uso de saponinas (*p. ej.,* el uso de Quil A, derivado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina de América del Sur) como adyuvantes es familiar para la persona de experiencia ordinaria en la técnica (véanse, *p. ej.*, los documentos US 5,057,540 y EP 0 362 279 B1. EP 0 109 942 B1, WO 96/11711; WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes, y el método de su producción se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 5,057,540 y el documento EP 0 362 279 B1.

El adyuvante también puede incluir sales minerales tales como sales de aluminio o de calcio, en particular hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio.

Otra clase de adyuvantes de desviación de Th1 adecuados para uso en las composiciones incluye composiciones inmunoestimuladoras a base de proteínas de membrana exterior (OMP). Las composiciones inmunoestimuladoras a base de OMP son particularmente adecuadas como adyuvantes de la mucosa, *p. ej.,* para administración intranasal. Las composiciones inmunoestimuladoras a base de OMP son un género de preparaciones de (OMPs, que incluyen algunas porinas) de las bacterias Gram-negativas, *p. ej.,* la especie Neisseria, que son útiles como un soporte o en composiciones para inmunógenos, tales como antígenos bacterianos o virales (véase, *p. ej.,* la Patente de los Estados Unidos Nº 5,726,292; la Patente de los Estados Unidos Nº 4,707,543). Además, los proteosomas tienen la capacidad de auto-ensamblarse en vesículas o agrupaciones de OMP similares a vesículas de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, y para incorporarse de forma no covalente, coordinarse, asociarse (*p. ej.,* electrostática o hidrofóbicamente), o de otra manera cooperar con los antígenos de proteína (Ags), particularmente antígenos que tienen una porción hidrófoba. Proteosomas se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en la técnica (véase, *p. ej.,* la Patente de los Estados Unidos Nº 5,726,292 o la Patente de los Estados Unidos Nº 5,985,284; 2003/0044425).

Los proteosomas están compuestos principalmente de proteínas de membrana exterior químicamente extraídas (OMPs) de Neisseria meningitidis (principalmente porinas A y B así como OMP de clase 4), mantenidas en solución por detergente (Lowell G H. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine

M M, Woodrow G C, Kaper J B, Cobon G S, eds, New Generation Vaccines. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Los proteosomas se pueden formular con una diversidad de antígenos tales como proteínas purificadas o recombinantes derivadas de fuentes virales, que incluyen los polipéptidos PreF descritos en la presente. La eliminación gradual del detergente permite la formación de complejos hidrófobos en partículas de aproximadamente 100-200 nm de diámetro (Lowell G H. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine M M, Woodrow G C, Kaper J B, Cobon G S, eds, New Generation Vaccines. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

Combinaciones de diferentes adyuvantes también se pueden utilizar en composiciones con los antígenos PreF, vectores virales o moléculas de ácido nucleico descritos en la composición. Por ejemplo, como ya se indicó, QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL estará típicamente en el orden de 1:10 a 10:1; tales como 1:5 a 5:1, y de manera frecuente sustancialmente 1:1. Típicamente, la relación está en el intervalo de 2.5:1 a 1:1 3D-MPL:QS21 (tal como AS01 (GlaxoSmithKline)). Otra formulación de adyuvante de combinación incluye 3D-MPL y una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio (tal como AS04 (GlaxoSmithKline). Cuyo se formula en combinación, esta combinación puede potenciar una respuesta inmune de Th1 específica de antígeno.

En algunos casos, la formulación de adyuvante con una sal mineral, tal como una sal de calcio o de aluminio (aluminio), por ejemplo fosfato de calcio, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. En algunas realizaciones, el adyuvante incluye una emulsión de aceite y agua, *p. ej.,* una emulsión de aceite en agua (tal como MF59 (Novartis) o AS03 (GlaxoSmithKline). Un ejemplo de una emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, un tocol tal como un tocoferol, *p. ej.,* alfa-tocoferol, y un tensioactivo, tal como trioleato de sorbitán (Span 85) o monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween 80), en un soporte acuoso.

La composición farmacéutica contiene típicamente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno PreF, vector viral o molécula de ácido nucleico descrito y se puede preparar por técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, incluyendo aquellas para la administración a sujetos humanos, se describe generalmente en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the subunit y adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. New Trends y Developments in Vaccines, editado por Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryly, EE.UU. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, Patente de los Estados Unidos Nº 4,235,877, La conjugación de proteínas a macromoléculas se describe, por ejemplo por Likhite, Patente de los Estados Unidos Nº 4,372,945 y por Armor *et al.,* Patente de los Estados Unidos Nº 4,474,757, Típicamente, la cantidad de antígeno en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmune sin efectos secundarios adversos significativos.

La cantidad del antígeno PreF, vector viral o molécula de ácido nucleico descrito puede variar dependiendo del antígeno específico empleado, la vía y el protocolo de administración, y la población objetivo, por ejemplo. Típicamente, cada una de las dosis humanas comprenderá 1-1000 μg de proteína, tal como de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 100 μg, por ejemplo, de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 50 μg, tal como aproximadamente 1 μg, aproximadamente 2 μg, aproximadamente 5 μg, aproximadamente 10 μg, aproximadamente 15 μg, aproximadamente 20 μg, aproximadamente 25 μg, aproximadamente 30 μg, aproximadamente 40 μg o aproximadamente 50 μg. La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona en base a la población objeto (*p. ej.*, niño o persona de edad avanzada). Una cantidad óptima para una composición particular se puede averiguar mediante estudios estándares que implican la observación de títulos de anticuerpo y otras respuestas en los sujetos. Se entiende que una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno en una composición inmunogénica puede incluir una cantidad que es ineficaz para inducir una respuesta inmune mediante la administración de una sola dosis, pero que es efectiva tras la administración de múltiples dosificaciones, por ejemplo en un protocolo de administración de cebado-refuerzo.

En varios ejemplos, las composiciones farmacéuticas para inducir una respuesta inmune contra RSV en seres humanos incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de los antígenos PreF descritos, vectores virales o moléculas de ácido nucleico para la administración a niños (*p. ej.,* niños entre el nacimiento y 1 año, tal como entre 0 y 6 meses, en la edad de dosis inicial) o sujetos pacientes de edad avanzada (tal como un sujeto mayor que 65 años). Se apreciará que la elección del adyuvante puede ser diferente en estas aplicaciones diferentes, y el adyuvante óptimo y la concentración para cada situación se pueden determinar empíricamente por aquellos de experiencia en la técnica.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son vacunas que reducen o previenen la infección con RSV. En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénicas son vacunas que reducen o previenen una respuesta patológica después de la infección con RSV. Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas que contienen el antígeno PreF, vector viral o molécula de ácido nucleico descrito se formulan con por lo menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto de RSV. Por ejemplo, el organismo patógeno puede ser un patógeno del tracto respiratorio (tal como un virus o bacteria que provoca una infección respiratoria). En determinados casos, la composición farmacéutica contiene un antígeno derivado de un virus

patógeno distinto de RSV, tal como un virus que provoca una infección del tracto respiratorio, tal como influenza o parainfluenza. En otras realizaciones, los antígenos adicionales se seleccionan para facilitar la administración o reducir el número de inoculaciones requeridas para proteger a un sujeto frente a una pluralidad de organismos infecciosos. Por ejemplo, el antígeno se puede derivar de uno cualquiera de uno o más de influenza, hepatitis B, difteria, tétano, pertussis, influenza de Hemophilus, poliovirus, Streptococcus o Pneumococcus, entre otros.

F. Composiciones para uso en Métodos de Tratamiento

La referencia a métodos de tratamiento se refiere a sustancias/composiciones para uso en dichos métodos de tratamiento.

En varias realizaciones, los antígenos PreF descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye un antígeno PreF se utilizan para inducir una respuesta inmune a RSV en un sujeto. Por lo tanto, en varias realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica que incluye uno o más de los antígenos PreF descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno, se puede administrar a un sujeto con el fin de generar una respuesta inmune a RSV.

De acuerdo con la divulgación en la presente, una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica que incluye un antígeno PreF, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno, se administra a un sujeto en necesidad de un tratamiento de este tipo durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para prevenir, inhibir y/o mejorar una infección por RSV en un sujeto. La composición inmunogénica se administra en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune contra un antígeno de RSV, tal como la proteína F de RSV, en el sujeto.

En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto incluye (o codifica) una primera proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión, y una segunda proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión. En varias realizaciones, la composición administrada al sujeto incluye una mezcla (tal como aproximadamente una mezcla de 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, 3:2, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 3:5, 5:3, 1:5, 5:1, 5:7, 7:5), de una primera proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión y una segunda proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto incluye una primera nanopartícula de proteína que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo A, y una segunda nanopartícula de proteína que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto incluye una primera molécula de ácido nucleico (tal como un vector de expresión) que codifica una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo A, y una segunda molécula de ácido nucleico (tal como un vector de expresión) que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B.

En algunas realizaciones, una composición que incluye nanopartículas de ferritina que incluye la proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L se administra a un sujeto. En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto incluye una primera nanopartícula de ferritina que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo A, y una segunda nanopartícula de ferritina que incluye una proteína F de RSV recombinante estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), en donde la proteína F de RSV estabilizada se basa en una proteína F de RSV del subtipo B. Métodos para hacer nanopartículas de ferritina que incluyen un antígeno viral y su uso para fines de inmunización (p. ej., para inmunización contra antígenos de influenza) se han descrito en la técnica (véase, p. ej., Kanekiyo y colaborador, Nature, 499:102-106, 2013).

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para tratamiento que tiene, o está en riesgo de desarrollar una infección por RSV, por ejemplo, debido a la exposición o la posibilidad de exposición a RSV. Después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones terapéuticas descritas, el sujeto se

puede monitorizar para la infección por RSV, los síntomas asociados con la infección por RSV, o ambos. Debido a que casi todos los seres humanos se infectan con RSV hacia la edad de 3 años, el cohorte de nacimiento completo se incluye como una población relevante para la inmunización. Esto se podría hacer, por ejemplo, al comenzar un régimen de inmunización en cualquier momento desde el nacimiento a 6 meses de edad, desde 6 meses de edad a 5 años, en mujeres embarazadas (o mujeres en edad portadora de niños) para proteger a sus niños mediante la transferencia pasiva del anticuerpo, miembros de familia de infantes recién nacidos o aquellos todavía en el útero, y sujetos mayores que 50 años.

Los sujetos en riesgo máximo de infección por RSV con síntomas graves (*p. ej.,* que requieren hospitalización) incluyen niños con prematurez, displasia broncopulmonar y enfermedad cardíaca congénita son más susceptibles a la enfermedad grave. La atopia o un historial familiar de atopia se han asociado con la enfermedad grave en la infancia. Durante la niñez y la etapa adulta, la enfermedad es más leve pero se puede asociar con la enfermedad de las vías respiratorias inferiores y comúnmente se complica por sinusitis. La gravedad de la enfermedad aumenta en las personas de edad avanzada institucionalizadas (*p. ej.,* seres humanos mayores que 65 años). La enfermedad grave también se produce en personas con enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave, o después del trasplante de médula ósea o de pulmón. (Véase, *p. ej.,* Shay *et al.,* JAMA, 282:1440-6, 1999; Hall *et al.,* N Engl J Med 2009;360:588-598; Glezen *et al., Am J Dis Child,* 1986;140:543-546; y Graham, Immunol. Rev., 239:149-166, 2011). Por lo tanto, estos sujetos se pueden seleccionar para la administración de los antígenos PreF descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, que expresa o que incluye un antígeno PreF.

Los sujetos típicos propuestos para el tratamiento con las composiciones y los métodos de la presente divulgación incluyen seres humanos, así como primates no humanos y otros animales, tal como ganado. Para identificar sujetos para profilaxis o tratamiento de acuerdo con los métodos de la divulgación, los métodos de detección empleados para determinar factores de riesgo asociados con una enfermedad o afección fijada como objetivo o sospechosa, o para determinar el estado de una enfermedad o afección existente en un sujeto. Estos métodos de detección incluyen, por ejemplo, desarrollos convencionales para determinar los factores ambientales, familiares, ocupacionales u otros factores de riesgo que se puedan asociar con la enfermedad o afección fijada como objetivo o sospechosa, así como métodos de diagnóstico, tales como diversos ELISA y otros métodos de inmunoensayo, que están disponibles y son bien conocidos en la técnica para detectar y/o caracterizar la infección por RSV. Estos y otros métodos de rutina permiten al médico seleccionar pacientes en necesidad de terapia utilizyo los métodos y las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Una composición inmunogénica se puede administrar como un programa de profilaxis o de tratamiento independiente, o como un régimen de tratamiento de seguimiento, adjunto o coordinado a otros tratamientos.

La composición inmunogénica se puede utilizar en protocolos de vacunación coordinados o formulaciones combinatorias. En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas combinatorias y los protocolos de inmunización coordinados emplean inmunógenos o formulaciones separadas, cada uno dirigido a inducir una respuesta inmune al antígeno de RSV, tal como una respuesta inmune a la proteína F de RSV. Composiciones inmunogénicas separadas que inducen la respuesta inmune al antígeno de RSV se pueden combinar en una composición inmunogénica polivalente administrada a un sujeto en una sola etapa de inmunización, o se pueden administrar por separado (en composiciones inmunogénicas monovalentes) en un protocolo de inmunización coordinado.

La administración de las composiciones inmunogénicas puede ser ya sea para un fin profiláctico o terapéutico. Cuyo se proporciona profilácticamente, la composición inmunogénica se proporciona por adelantado de cualquier síntoma, por ejemplo por adelantado de la infección. La administración profiláctica de las composiciones inmunogénicas sirve para prevenir o mejorar cualquier infección posterior. Cuyo se proporciona terapéuticamente, la composición inmunogénica se proporciona en o después del inicio de un síntoma de la enfermedad o infección, por ejemplo después del desarrollo de un síntoma de la infección por RSV, o después del diagnóstico de la infección por RSV. La composición inmunogénica se puede proporcionar, por lo tanto, antes de la exposición anticipada al RSV para atenuar la gravedad anticipada, duración o grado de una infección y/o síntomas de la enfermedad asociados, después de la exposición o la exposición sospechosa al virus, o después del inicio real de una infección.

La administración induce una respuesta inmune suficiente para tratar o prevenir la infección patogénica, por ejemplo, para inhibir la infección y/o reducir los signos y/o síntomas de la infección. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad, el estado general de la salud del sujeto y la robustez del sistema inmune del sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones inmunogénicas descritas es aquella que proporciona ya sea un alivio subjetivo de un(os) síntoma(s) o una mejora objetivamente identificable como es observada por el médico u otro observador cualificado.

Para fines profilácticos y terapéuticos, la composición inmunogénica se puede administrar al sujeto en un suministro de un solo bolo, por la vía de suministro continuo (por ejemplo, el suministro continuo transdérmico, mucosal o intravenoso) durante un período de tiempo prolongado, o en un protocolo de administración repetida (por ejemplo, mediante un protocolo de administración repetido por hora, por día o por semana). La dosis

terapéuticamente efectiva de la composición inmunogénica se puede proporcionar como dosis repetidas con un régimen de profilaxis o tratamiento prolongado que producirá resultados clínicamente significativos para aliviar uno o más síntomas o afecciones detectables asociados con una enfermedad o afección fijada como objetivo como expone en la presente. La determinación de dosificaciones eficaces en este contexto se basa típicamente en estudios en modelos de animales, seguido por ensayos clínicos humanos y es guiada por protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o gravedad de los síntomas o afecciones de la enfermedad fijada como objetivo en el sujeto. Modelos adecuados a este respecto incluyen, por ejemplo murino, rata, porcino, felino, hurón, primate no humano u otros modelo de animal aceptado conocido en la técnica. Alternativamente, las dosificaciones eficaces se pueden determinar utilizyo modelos *in vitro* (por ejemplo, para los ensayos inmunológicos e histopatológicos). Utilizyo modelos de este tipo, únicamente se requieren cálculos y ajustes ordinarios para determinar una concentración y dosis apropiada para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición inmunogénica (por ejemplo, cantidades que son eficaces para inducir una respuesta inmune deseada o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad fijada como objetivo). En realizaciones alternativas, una cantidad eficaz o dosis eficaz de la composición inmunogénica puede simplemente inhibir o potenciar una o más actividades biológicas seleccionadas correlacionadas con una enfermedad o afección, como se expone en la presente, para fines ya sea terapéuticos o de diagnóstico.

En una realización, un régimen de inmunización adecuado incluye por lo menos tres inoculaciones separadas con una o más composiciones inmunógenas, administrándose una segunda inoculación más de aproximadamente dos, aproximadamente tres a ocho, o aproximadamente cuatro semanas después de la primera inoculación. Generalmente, la tercera inoculación se administra varios meses después de la segunda inoculación, y en realizaciones específicas, más de aproximadamente cinco meses después de la primera inoculación, más de aproximadamente seis meses a aproximadamente dos años después de la primera inoculación, o aproximadamente ocho meses a aproximadamente un año después de la primera inoculación. Las inoculaciones periódicas más allá de la tercera también son deseables para potenciar la "memoria inmune" del sujeto. La adecuación de los parámetros de vacunación elegidos, *p. ej.,* formulación, dosis, régimen y similares, se pueden determinar al tomar partes alícuotas de suero del sujeto y ensayar los títulos de anticuerpos durante el curso del programa de inmunización. Si una monitorización de este tipo indica que la vacunación es sub-óptima, el sujeto se puede reforzar con una dosis adicional de composición inmunogénica, y los parámetros de vacunación se pueden modificar en un aspecto esperado para potenciar la respuesta inmune. Se contempla que pueden haber varios refuerzos, y que cada uno de los refuerzos puede incluir el mismo o diferente antígeno PreF.

Para protocolos de cebado-refuerzo, el cebado se puede administrar como una sola dosis o múltiples dosis, por ejemplo dos dosis, tres dosis, cuatro dosis, cinco dosis, seis dosis o más se pueden administrar a un sujeto durante días, semanas o meses. El refuerzo se puede administrar como una sola dosis o múltiples dosis, por ejemplo dos a seis dosis, o más se pueden administrar a un sujeto durante un día, una semana o meses. También se puede dar múltiples refuerzos, tal como uno a cinco, o más. Diferentes dosificaciones se pueden utilizar en una serie de inoculaciones secuenciales. Por ejemplo, una dosis relativamente grye en una inoculación primaria y luego un refuerzo con dosis relativamente más pequeñas. La respuesta inmune contra la superficie antigénica seleccionada se puede generar por una o más inoculaciones de un sujeto con una composición inmunogénica descrita en la presente.

En algunas realizaciones, la composición de cebado administrada al sujeto incluye (o codifica) una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión, y la composición de refuerzo administrada al sujeto incluye (o codifica) una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión. En algunas realizaciones, la composición de cebado administrada al sujeto incluye (o codifica) una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión, y la composición de refuerzo administrada al sujeto incluye (o codifica) una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen administrar una composición que incluye una proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y una proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión una vez, o más de una (como en el protocolo de cebado-refuerzo) como una serie de inyecciones.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen administrar una composición que incluye una nanopartícula de ferritina que incluye una proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y una nanopartícula de ferritina que incluye una proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, una vez, o más de una (tal como en un protocolo de cebado-refuerzo) como una serie de inyecciones.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la administración de una composición que incluye un vector que codifica una proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y un vector que codifica una proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de

prefusión, una vez, o más de una (tal como en un protocolo de cebado-refuerzo) como una serie de inyecciones. En algunas realizaciones, el método puede incluir, además, la administración de una composición que incluye la proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y la proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, y/o una composición que incluye una nanopartícula de ferritina que incluye un proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y nanopartícula de ferritina que incluye una proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la administración de una composición que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión una vez, o más de una (tal como en un protocolo de inicio-refuerzo) como una serie de inyecciones. En algunas realizaciones, el método puede incluir, además, la administración de una composición que incluye la proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y la proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión, y/o una composición que incluye una nanopartícula de ferritina que incluye un proteína F de RSV del subtipo A recombinante estabilizada en una conformación de prefusión y una nanopartícula de ferritina que incluye una proteína F de RSV del subtipo B recombinante estabilizada en una conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, las composiciones de cebado y refuerzo administradas al sujeto incluye (o codifica) cada una una primera proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión, y una segunda proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión. En varias realizaciones, las composiciones de cebado y refuerzo administradas al sujeto pueden incluir (o codificar) una mezcla (tal como aproximadamente una mezcla de 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, 3:2, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 3:5, 5:3, 1:5, 5:1, 5:7, 7:5), de una primera proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión, y una segunda proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, las composiciones de cebado y refuerzo administradas al sujeto incluye cada una una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión por las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, y una segunda proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L).

En algunas realizaciones las composiciones de cebado y refuerzo administradas al sujeto incluye cada una una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, y una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L).

En algunas realizaciones las composiciones de cebado y refuerzo administradas al sujeto incluye cada una una primera nanopartícula de proteína (tal como una nanopartícula de ferritina) que incluye una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, y una segunda nanopartícula de proteína (tal como una nanopartícula de ferritina) que incluye una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L).

En algunas realizaciones las composiciones de cebado y refuerzo administrada al sujeto incluye cada una un vector que incluye o codifica una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L, y un vector que incluye o codifica una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L).

En algunas realizaciones, la composición de cebado administrada al sujeto incluye una primera molécula de ácido nucleico (tal como un vector de expresión de plásmido de ADN) que codifica una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión mediante las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L y una segunda molécula de ácido nucleico (tal como un vector de expresión) que incluye una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del

subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), y la composición de refuerzo administrada al sujeto incluye una primera nanopartícula de proteína (tal como una nanopartícula de ferritina) que incluye una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo A estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L), y una segunda nanopartícula de proteína (tal como una nanopartícula de ferritina) que incluye una proteína F de RSV recombinante que es una proteína F de RSV del subtipo B estabilizada en una conformación de prefusión mediante cualquiera de las sustituciones descritas en la presente (tales como sustituciones S155C, S290C y S190F o sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L).

Protocolos de inmunización utilizyo un cebado de plásmido de ADN y refuerzo de nanopartículas de ferritina son conocidos por la persona de experiencia ordinaria en la técnica (véase, p. ej., Wei et al., Science, 329(5995):1060-4, 2010).

La dosificación real de la composición inmunogénica variará de acuerdo con factores tales como la indicación de la enfermedad y el estado particular del sujeto (por ejemplo, la edad, tamaño, firmeza, grado de síntomas, factores de susceptibilidad del sujeto y similares), el tiempo y la vía de administración, otros fármacos o tratamientos que son administrados concurrentemente, así como la farmacología específica de la composición inmunogénica para inducir la actividad o respuesta biológica deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar una respuesta profiláctica o terapéutica óptima. Como se describe arriba en el listado de términos y expresiones, una cantidad eficaz también es una en la cual cualquiera de los efectos secundarios tóxicos o perjudiciales del antígeno descrito y/u otro agente biológicamente activo se sobrepasa en términos clínicos por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Un intervalo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de los antígenos PreF descritos dentro de los métodos y las composiciones inmunogénicas de la divulgación es aproximadamente 0.0001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, tal como aproximadamente 0.01 mg/kg, aproximadamente 0.02 mg/kg, aproximadamente 0.03 mg/kg, aproximadamente 0.04 mg/kg, aproximadamente 0.05 mg/kg, aproximadamente 0.06 mg/kg, aproximadamente 0.07 mg/kg, aproximadamente 0.08 mg/kg, aproximadamente 0.09 mg/kg, aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.2 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, aproximadamente 0.4 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg, aproximadamente 0.6 mg/kg, aproximadamente 0.7 mg/kg, aproximadamente 0.8 mg/kg, aproximadamente 0.9 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1.5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo 0.01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1.0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, la dosificación de una cantidad de ajuste del antígeno PreF descrito, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye un antígeno PreF incluye para niños, adultos, personas de edad avanzada, etc., tal como de aproximadamente 1-300 μg, por ejemplo, una dosificación de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o aproximadamente 300 μg de los antígenos PreF, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye un antígeno PreF. La dosificación y el número de dosis dependerá de la instalación, por ejemplo, en un adulto o cualquiera cebado por la infección o inmunización de RSV previa, una dosis única puede ser un refuerzo suficiente. En niños que no han recibido tratamiento, en algunos ejemplos, se darán por lo menos dos dosis, por ejemplo, por lo menos tres dosis. En algunas realizaciones, un refuerzo anual se da a sujetos de edad avanzada (p. ej., seres humanos de más de 60 años) una vez al año, por ejemplo, junto con una vacunación contra la influenza anual. Métodos para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen en más detalle en publicaciones tales como *Remingtons Pharmaceutical Sciences,* 19ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1995.

La dosificación se puede variar por el médico asistente para mantener una concentración deseada en un sitio diana (por ejemplo, circulación sistémica). Concentraciones más altas o más bajas se pueden seleccionar en base al modo de suministro, por ejemplo, el suministro trans-epidérmico, rectal, oral, pulmonar o intranasal frente al suministro intravenoso o subcutáneo. La dosificación también se puede ajustar en base a la tasa de liberación de la formulación administrada, por ejemplo, de una pulverización intrapulmonar frente a polvo, formulaciones de suministro oral de liberación sostenida frente a material en partículas inyectado o transdérmico, y así sucesivamente. Para lograr el mismo nivel de concentración en el suero, por ejemplo, partículas de liberación lenta con una tasa de liberación de 5 nanomolar (bajo condiciones estándares) serían administradas en aproximadamente dos veces la dosificación de partículas con una tasa de liberación de 10 nanomolar.

Tras la administración de una composición inmunogénica de esta divulgación, el sistema inmune del sujeto responde típicamente a la composición inmunogénica al producir anticuerpos específicos para la conformación de prefusión de la proteína F de RSV. Una respuesta de este tipo significa que se suministró una dosis efectiva

de la composición inmunogénica.

En varias realizaciones, puede ser ventajoso administrar las composiciones inmunogénicas descritas en la presente con otros agentes tales como proteínas, péptidos, anticuerpos u otros agentes antivirales, tales como agentes anti-RSV. Ejemplos no limitantes de agentes anti-RSV incluyen el anticuerpo monoclonal palivizumab (SYNAGIS®; Medimmune, Inc.) y el fármaco anti-viral de moléculas pequeñas ribavirina (fabricado por muchas fuentes, *p. ej.,* Warrick Pharmaceuticals, Inc.). En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas se administran concurrentemente con otros agentes anti-RSV. En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas se administran secuencialmente con otros agentes terapéuticos anti-RSV, tal como antes o después del otro agente. Uno de experiencia ordinaria en la técnica sabría qué administración secuencial puede seguir inmediatamente o después de un período de tiempo apropiado, tal como horas, días, semanas, meses o incluso años más tarde.

En realizaciones adicionales, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye un ácido nucleico que codifica un antígeno PreF descrito se administra a un sujeto con el fin de generar una respuesta inmune. En un ejemplo no limitante, específico, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico que codifica un antígeno descrito se administra a un sujeto para tratar o prevenir o inhibir la infección por RSV.

Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es la inmunización directa con el ADN de plásmido, tal como con un plásmido de expresión de mamífero. Como se describió arriba, la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno descrito se puede colocar bajo el control de un promotor para incrementar la expresión de la molécula. Otro enfoque utilizaría ARN (tal como el suministro no viral de vacunas de ARN de auto-amplificación, véase, p. ej., Geall et al., Proc Natl Acad Sci USA, 109:14604-9, 2012).

La inmunización mediante construcciones de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se enseña, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nº 5,643,578 (que describe métodos para inmunizar vertebrados al introducir ADN que codifica un antígeno deseado para inducir una respuesta mediada por células o humoral), y la Patente de los Estados Unidos Nº 5,593,972 y la Patente de los Estados Unidos Nº 5,817,637 (que describe enlazar operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno a secuencias reguladoras que habilitan la expresión). La Patente de los Estados Unidos Nº 5,880,103 describe varios métodos de suministro de ácidos nucleicos que codifican péptidos inmunogénicos u otros antígenos a un organismo. Los métodos incluyen el suministro liposomal de los ácidos nucleicos (o de los péptidos sintéticos por sí mismos) y construcciónes de estimulación inmune, o ISCOMS™, estructuras similares a una jaula negativamente cargadas de 30-40 nm de tamaño formadas espontáneamente al mezclar colesterol y Quil A™ (saponina). La inmunidad protectora se ha generado en una diversidad de modelos experimentales de infección, incluyendo toxoplasmosis y tumores inducidos por el virus Epstein-Barr, utilizyo ISCOMS™ como vehículo de suministro para antígenos (Mowat y Donachie, *Immunol. Today* 12:383, 1991). Se ha encontrado que dosis de antígeno tan bajas como 1 µg encapsuladas en ISCOMS™ producen respuestas de CTL mediadas por Clase I (Takahashi *et al.,* Nature 344:873, 1990).

En otro enfoque para utilizar ácidos nucleicos para la inmunización, un antígeno descrito también se puede expresar por huéspedes virales atenuados o vectores o vectores bacterianos. El virus de vaccinia recombinante, adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), virus herpes, retrovirus, citomegalovirus u otros vectores virales se pueden utilizar para expresar el péptido o la proteína, para de esta manera inducir una respuesta CTL. Por ejemplo, los vectores de vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización se describen en la Patente de loa Estados Unidos Nº 4,722,848. BCG (Bacillus Calmette Guerin) proporciona otro vector para la expresión de los péptidos (véase Stover, *Nature* 351:456-460, 1991).

En una realización, un ácido nucleico que codifica un antígeno PreF descrito se introduce directamente en las células. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede cargar en microesferas de oro mediante métodos estándares e introducir en la piel mediante un dispositivo tal como la Pistola de Genes HELIOS™ de Bio-Rad. Los ácidos nucleicos pueden ser "desnudos" que consisten en plásmidos bajo el control de un promotor fuerte. Típicamente, el ADN se inyecta en el músculo, aunque también se puede inyectar directamente en otros sitios, incluyendo tejidos en proximidad a la metástasis. Las dosificaciones para inyección son usualmente de alrededor de 0.5 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, y típicamente son de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg (véase, *p. ej.,* la Patente de los Estados Unidos Nº 5,589,466).

Además de los métodos terapéuticos arriba proporcionados, se puede utilizar cualquiera de los antígenos PreF descritos para producir reactivos de inmunodiagnóstico específicos de antígeno, por ejemplo, para serosupervivencia. Los reactivos de inmunodiagnóstico se pueden diseñar a partir de cualquiera de los antígenos descritos en la presente. Por ejemplo, en el caso de los antígenos descritos, la presencia de anticuerpos de suero a RSV se monitoriza utilizyo los antígenos aislados descrito en la presente, tal como para detectar una infección de RSV y/o la presencia de anticuerpos que específicamente se unen a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV.

Generalmente, el método incluye poner en contacto una muestra de un sujeto, tal como, pero no limitada a una muestra de sangre, suero, plasma, orina o esputo del sujeto con una o más del antígeno de proteína F de RSV estabilizado en una conformación de prefusión descrita en la presente y al detectar la unión de los anticuerpos en la muestra a los inmunógenos descritos. La unión se puede detectar por cualquier medio conocido por uno de experiencia en la técnica, incluyendo el uso de anticuerpos secundarios marcados que específicamente unen los anticuerpos de la muestra. Las marcas incluyen radiomarcas, marcas enzimáticas y marcas fluorescentes.

Además, la detección del anticuerpo de unión de F de RSV de prefusión también permite la respuesta del sujeto de inmunización con el antígeno descrito a monitorizar. En todavía otras realizaciones, se determina el título de los anticuerpos de unión de anticuerpo de F de RSV de prefusión. La unión se puede detectar por cualquier medio conocido para uno de experiencia en la técnica, incluyendo el uso de anticuerpos secundarios marcados que específicamente unen los anticuerpos de la muestra. Las marcas incluyen radiomarcas, marcas enzimáticas y marcas fluorescentes. En otras realizaciones, se utiliza un inmunógeno descrito para aislar anticuerpos presentes en un sujeto o muestra biológica obtenida de un sujeto.

G. Kits

También se proporcionan kits. Por ejemplo, kits para tratar o prevenir una infección por RSV en un sujeto, o para detectar la presencia de anticuerpos específicos de prefusión de la proteína F de RSV en el suero de un sujeto. Los kits incluirán típicamente uno o más de los antígenos PreF, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno.

El kit puede incluir un recipiente y una marca o inserción del envase en o asociado con el recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes contenedores se pueden formar a partir de una diversidad de materiales tal como vidrio o plástico. El recipiente contiene típicamente una composición que incluye uno o más de los antígenos PreF descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno, que es eficaz para tratar o prevenir una infección por RSV. En varias realizaciones, el recipiente puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La marca o inserción del envase indica que la composición se utiliza para tratar la afección particular.

La marca o inserción del envase además incluirá, típicamente, instrucciones para el uso de un antígeno PreF, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno, por ejemplo, en un método para tratar o prevenir una infección por RSV. La inserción del envase incluye típicamente instrucciones usualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información acerca de las indicaciones, utilización, dosificación, admsinistración, contraindicaciones y/o advertencias concernientes al uso de productos terapéuticos de este tipo. Los materiales de instrucción pueden ser escritos, en una forma electrónica (tal como un disquete de computadora o disco compacto) o pueden ser visuales (tales como archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la cual está diseñado el kit. Los kits pueden incluir adicionalmente tampones u otros reactivos rutinariamente utilizados para la práctica de un método particular. Kits y contenidos apropiados de este tipo con bien conocidos para aquellos de experiencia en la técnica.

Como se utiliza en la presente, la referencia a:

"cualquiera de SEQ ID NOs: 1-184" se refiere a "SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ

ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 184".

"SEQ ID NOs: 698-828" se refiere a "una cualquiera de "SEQ ID NO: 699, SEQ ID NO: 700, SEQ ID NO: 701, SEQ ID NO: 702, SEQ ID NO: 703, SEQ ID NO: 704, SEQ ID NO: 705, SEQ ID NO: 706, SEQ ID NO: 707, SEQ ID NO: 708, SEQ ID NO: 709, SEQ ID NO: 710, SEQ ID NO: 711, SEQ ID NO: 712, SEQ ID NO: 713, SEQ ID NO: 714, SEQ ID NO: 715, SEQ ID NO: 716, SEQ ID NO: 717, SEQ ID NO: 718, SEQ ID NO: 719, SEQ ID NO: 720, SEQ ID NO: 721, SEQ ID NO: 722, SEQ ID NO: 723, SEQ ID NO: 724, SEQ ID NO: 725, SEQ ID NO: 726, SEQ ID NO: 727, SEQ ID NO: 728, SEQ ID NO: 729, SEQ ID NO: 730, SEQ ID NO: 731, SEQ ID NO: 732, SEQ ID NO: 733, SEQ ID NO: 734, SEQ ID NO: 735, SEQ ID NO: 736, SEQ ID NO: 737, SEQ ID NO: 738, SEQ ID NO: 739, SEQ ID NO: 740, SEQ ID NO: 741, SEQ ID NO: 742, SEQ ID NO: 743, SEQ ID NO: 744, SEQ ID NO: 745, SEQ ID NO: 746, SEQ ID NO: 747, SEQ ID NO: 748, SEQ ID NO: 749, SEQ ID NO: 750, SEQ ID NO: 751, SEQ ID NO: 752, SEQ ID NO: 753, SEQ ID NO: 754, SEQ ID NO: 755, SEQ ID NO: 756, SEQ ID NO: 757, SEQ ID NO: 758, SEQ ID NO: 759, SEQ ID NO: 760, SEQ ID NO: 761, SEQ ID NO: 762, SEQ ID NO: 763, SEQ ID NO: 764, SEQ ID NO: 765, SEQ ID NO: 766, SEQ ID NO: 767, SEQ ID NO: 768, SEQ ID NO: 769, SEQ ID NO: 770, SEQ ID NO: 771, SEQ ID NO: 772, SEQ ID NO: 773, SEQ ID NO: 774, SEQ ID NO: 775, SEQ ID NO: 776, SEQ ID NO: 777, SEQ ID NO: 778, SEQ ID NO: 779, SEQ ID NO: 780, SEQ ID NO: 781, SEQ ID NO: 782, SEQ ID NO: 783, SEQ ID NO: 784, SEQ ID NO: 785, SEQ ID NO: 786, SEQ ID NO: 787, SEQ ID NO: 788, SEQ ID NO: 789, SEQ ID NO: 790, SEQ ID NO: 791, SEQ ID NO: 792, SEQ ID NO: 793, SEQ ID NO: 794, SEQ ID NO: 795, SEQ ID NO: 796, SEQ ID NO: 797, SEQ ID NO: 798, SEQ ID NO: 799, SEQ ID NO: 800, SEQ ID NO: 801, SEQ ID NO: 802, SEQ ID NO: 803, SEQ ID NO: 804, SEQ ID NO: 805, SEQ ID NO: 806, SEQ ID NO: 807, SEQ ID NO: 808, SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813, SEQ ID NO: 814, SEQ ID NO: 815, SEQ ID NO: 816, SEQ ID NO: 817, SEQ ID NO: 818, SEQ ID NO: 819, SEQ ID NO: 820, SEQ ID NO: 821, SEQ ID NO: 822, SEQ ID NO: 823, SEQ ID NO: 824, SEQ ID NO: 825, SEQ ID NO: 826, SEQ ID NO: 827 o SEQ ID NO: 828".

"SEQ ID NOs: 1474-1478" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 1474, SEQ ID NO: 1475, SEQ ID NO: 1476, SEQ ID NO: 1477 o SEQ ID NO: 1478".

"SEQ ID NOs: 829-1025" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 829, SEQ ID NO: 830, SEQ ID NO: 831, SEQ ID NO: 832, SEQ ID NO: 833, SEQ ID NO: 834, SEQ ID NO: 835, SEQ ID NO: 836, SEQ ID NO: 837, SEQ ID NO: 838, SEQ ID NO: 839, SEQ ID NO: 840, SEQ ID NO: 841, SEQ ID NO: 842, SEQ ID NO: 843, SEQ ID NO: 844, SEQ ID NO: 845, SEQ ID NO: 846, SEQ ID NO: 847, SEQ ID NO: 848, SEQ ID NO: 849, SEQ ID NO: 850, SEQ ID NO: 851, SEQ ID NO: 852, SEQ ID NO: 853, SEQ ID NO: 854, SEQ ID NO: 855, SEQ ID NO: 856, SEQ ID NO: 857, SEQ ID NO: 858, SEQ ID NO: 859, SEQ ID NO: 860, SEQ ID NO: 861, SEQ ID NO: 862, SEQ ID NO: 863, SEQ ID NO: 864, SEQ ID NO: 865, SEQ ID NO: 866, SEQ ID NO: 867, SEQ ID NO: 868, SEQ ID NO: 869, SEQ ID NO: 870, SEQ ID NO: 871, SEQ ID NO: 872, SEQ ID NO: 873, SEQ ID NO: 874, SEQ ID NO: 875, SEQ ID NO: 876, SEQ ID NO: 877, SEQ ID NO: 878, SEQ ID NO: 879, SEQ ID NO: 880, SEQ ID NO: 881, SEQ ID NO: 882, SEQ ID NO: 883, SEQ ID NO: 884, SEQ ID NO: 885, SEQ ID NO: 886, SEQ ID NO: 887, SEQ ID NO: 888, SEQ ID NO: 889, SEQ ID NO: 890, SEQ ID NO: 891, SEQ ID NO: 892, SEQ ID NO: 893, SEQ ID NO: 894, SEQ ID NO: 895, SEQ ID NO: 896, SEQ ID NO: 897, SEQ ID NO: 898, SEQ ID NO: 899, SEQ ID NO: 900, SEQ ID NO: 901, SEQ ID NO: 902, SEQ ID NO: 903, SEQ ID NO: 904, SEQ ID NO: 905, SEQ ID NO: 906, SEQ ID NO: 907, SEQ ID NO: 908, SEQ ID NO: 909, SEQ ID NO: 910, SEQ ID NO: 911, SEQ ID NO: 912, SEQ ID NO: 913, SEQ ID NO: 914, SEQ ID NO: 915, SEQ ID NO: 916, SEQ ID NO: 917, SEQ ID NO: 918, SEQ ID NO: 919, SEQ ID NO: 920, SEQ ID NO: 921, SEQ ID NO: 922, SEQ ID NO: 923, SEQ ID NO: 924, SEQ ID NO: 925, SEQ ID NO: 926, SEQ ID NO: 927, SEQ ID NO: 928, SEQ ID NO: 929, SEQ ID NO: 930, SEQ ID NO: 931, SEQ ID NO: 932, SEQ ID NO: 933, SEQ ID NO: 934, SEQ ID NO: 935, SEQ ID NO: 936, SEQ ID NO: 937, SEQ ID NO: 938, SEQ ID NO: 939, SEQ ID NO: 940, SEQ ID NO: 941, SEQ ID NO: 942, SEQ ID NO: 943, SEQ ID NO: 944, SEQ ID NO: 945, SEQ ID NO: 946, SEQ ID NO: 947, SEQ ID NO: 948, SEQ ID NO: 949, SEQ ID NO: 950, SEQ ID NO: 951, SEQ ID NO: 952, SEQ ID NO: 953, SEQ ID NO: 954, SEQ ID NO: 955, SEQ ID NO: 956, SEQ ID NO: 957, SEQ ID NO: 958, SEQ ID NO: 959, SEQ ID NO: 960, SEQ ID NO: 961, SEQ ID NO: 962, SEQ ID NO: 963, SEQ ID NO: 964, SEQ ID NO: 965, SEQ ID NO: 966, SEQ ID NO: 967, SEQ ID NO: 968, SEQ ID NO: 969, SEQ ID NO: 970, SEQ ID NO: 971, SEQ ID NO: 972, SEQ ID NO: 973, SEQ ID NO: 974, SEQ ID NO: 975, SEQ ID NO: 976, SEQ ID NO: 977, SEQ ID NO: 978, SEQ ID NO: 979, SEQ ID NO: 980, SEQ ID NO: 981, SEQ ID NO: 982, SEQ ID NO: 983, SEQ ID NO: 984, SEQ ID NO: 985, SEQ ID NO: 986, SEQ ID NO: 987, SEQ ID NO: 988, SEQ ID NO: 989, SEQ ID NO: 990, SEQ ID NO: 991, SEQ ID NO: 992, SEQ ID NO: 993, SEQ ID NO: 994, SEQ ID NO: 995, SEQ ID NO: 996, SEQ ID NO: 997, SEQ ID NO: 998, SEQ ID NO: 999, SEQ ID NO: 1000, SEQ ID NO: 1001, SEQ ID NO: 1002, SEQ ID NO: 1003, SEQ ID NO: 1004, SEQ ID NO: 1005, SEQ ID NO: 1006, SEQ ID NO: 1007, SEQ ID NO: 1008, SEQ ID NO: 1009, SEQ ID NO: 1010, SEQ ID NO: 1011, SEQ ID NO: 1012, SEQ ID NO: 1013, SEQ ID NO: 1014, SEQ ID NO: 1015, SEQ ID NO: 1016, SEQ ID NO: 1017,

SEQ ID NO: 1018, SEQ ID NO: 1019, SEQ ID NO: 1020, SEQ ID NO: 1021, SEQ ID NO: 1022, SEQ ID NO: 1023, SEQ ID NO: 1024 o SEQ ID NO: 1025".

"SEQ ID NOs: 969-1025" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 969, SEQ ID NO: 970, SEQ ID NO: 971, SEQ ID NO: 972, SEQ ID NO: 973, SEQ ID NO: 974, SEQ ID NO: 975, SEQ ID NO: 976, SEQ ID NO: 977, SEQ ID NO: 978, SEQ ID NO: 979, SEQ ID NO: 980, SEQ ID NO: 981, SEQ ID NO: 982, SEQ ID NO: 983, SEQ ID NO: 984, SEQ ID NO: 985, SEQ ID NO: 986, SEQ ID NO: 987, SEQ ID NO: 988, SEQ ID NO: 989, SEQ ID NO: 990, SEQ ID NO: 991, SEQ ID NO: 992, SEQ ID NO: 993, SEQ ID NO: 994, SEQ ID NO: 995, SEQ ID NO: 996, SEQ ID NO: 997, SEQ ID NO: 998, SEQ ID NO: 999, SEQ ID NO: 1000, SEQ ID NO: 1001, SEQ ID NO: 1002, SEQ ID NO: 1003, SEQ ID NO: 1004, SEQ ID NO: 1005, SEQ ID NO: 1006, SEQ ID NO: 1007, SEQ ID NO: 1008, SEQ ID NO: 1009, SEQ ID NO: 1010, SEQ ID NO: 1011, SEQ ID NO: 1012, SEQ ID NO: 1013, SEQ ID NO: 1014, SEQ ID NO: 1015, SEQ ID NO: 1016, SEQ ID NO: 1017, SEQ ID NO: 1018, SEQ ID NO: 1019, SEQ ID NO: 1020, SEQ ID NO: 1021, SEQ ID NO: 1022, SEQ ID NO: 1023, SEQ ID NO: 1024 o SEQ ID NO: 1025".

"SEQ ID NOs: 901-968" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 901, SEQ ID NO: 902, SEQ ID NO: 903, SEQ ID NO: 904, SEQ ID NO: 905, SEQ ID NO: 906, SEQ ID NO: 907, SEQ ID NO: 908, SEQ ID NO: 909, SEQ ID NO: 910, SEQ ID NO: 911, SEQ ID NO: 912, SEQ ID NO: 913, SEQ ID NO: 914, SEQ ID NO: 915, SEQ ID NO: 916, SEQ ID NO: 917, SEQ ID NO: 918, SEQ ID NO: 919, SEQ ID NO: 920, SEQ ID NO: 921, SEQ ID NO: 922, SEQ ID NO: 923, SEQ ID NO: 924, SEQ ID NO: 925, SEQ ID NO: 926, SEQ ID NO: 927, SEQ ID NO: 928, SEQ ID NO: 929, SEQ ID NO: 930, SEQ ID NO: 931, SEQ ID NO: 932, SEQ ID NO: 933, SEQ ID NO: 934, SEQ ID NO: 935, SEQ ID NO: 936, SEQ ID NO: 937, SEQ ID NO: 938, SEQ ID NO: 939, SEQ ID NO: 940, SEQ ID NO: 941, SEQ ID NO: 942, SEQ ID NO: 943, SEQ ID NO: 944, SEQ ID NO: 945, SEQ ID NO: 946, SEQ ID NO: 947, SEQ ID NO: 948, SEQ ID NO: 949, SEQ ID NO: 950, SEQ ID NO: 951, SEQ ID NO: 952, SEQ ID NO: 953, SEQ ID NO: 954, SEQ ID NO: 955, SEQ ID NO: 956, SEQ ID NO: 957, SEQ ID NO: 958, SEQ ID NO: 959, SEQ ID NO: 960, SEQ ID NO: 961, SEQ ID NO: 962, SEQ ID NO: 963, SEQ ID NO: 964, SEQ ID NO: 965, SEQ ID NO: 966, SEQ ID NO: 967 o SEQ ID NO: 968".

"SEQ ID NOs: 1027-1218" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 1027, SEQ ID NO: 1028, SEQ ID NO: 1029, SEQ ID NO: 1030, SEQ ID NO: 1031, SEQ ID NO: 1032, SEQ ID NO: 1033, SEQ ID NO: 1034, SEQ ID NO: 1035, SEQ ID NO: 1036, SEQ ID NO: 1037, SEQ ID NO: 1038, SEQ ID NO: 1039, SEQ ID NO: 1040, SEQ ID NO: 1041, SEQ ID NO: 1042, SEQ ID NO: 1043, SEQ ID NO: 1044, SEQ ID NO: 1045, SEQ ID NO: 1046, SEQ ID NO: 1047, SEQ ID NO: 1048, SEQ ID NO: 1049, SEQ ID NO: 1050, SEQ ID NO: 1051, SEQ ID NO: 1052, SEQ ID NO: 1053, SEQ ID NO: 1054, SEQ ID NO: 1055, SEQ ID NO: 1056, SEQ ID NO: 1057, SEQ ID NO: 1058, SEQ ID NO: 1059, SEQ ID NO: 1060, SEQ ID NO: 1061, SEQ ID NO: 1062, SEQ ID NO: 1063, SEQ ID NO: 1064, SEQ ID NO: 1065, SEQ ID NO: 1066, SEQ ID NO: 1067, SEQ ID NO: 1068, SEQ ID NO: 1069, SEQ ID NO: 1070, SEQ ID NO: 1071, SEQ ID NO: 1072, SEQ ID NO: 1073, SEQ ID NO: 1074, SEQ ID NO: 1075, SEQ ID NO: 1076, SEQ ID NO: 1077, SEQ ID NO: 1078, SEQ ID NO: 1079, SEQ ID NO: 1080, SEQ ID NO: 1081, SEQ ID NO: 1082, SEQ ID NO: 1083, SEQ ID NO: 1084, SEQ ID NO: 1085, SEQ ID NO: 1086, SEQ ID NO: 1087, SEQ ID NO: 1088, SEQ ID NO: 1099, SEQ ID NO: 1100, SEQ ID NO: 1101, SEQ ID NO: 1102, SEQ ID NO: 1103, SEQ ID NO: 1104, SEQ ID NO: 1105, SEQ ID NO: 1106, SEQ ID NO: 1107, SEQ ID NO: 1108, SEQ ID NO: 1109, SEQ ID NO: 1110, SEQ ID NO: 1111, SEQ ID NO: 1112, SEQ ID NO: 1113, SEQ ID NO: 1114, SEQ ID NO: 1115, SEQ ID NO: 1116, SEQ ID NO: 1117, SEQ ID NO: 1118, SEQ ID NO: 1119, SEQ ID NO: 1120, SEQ ID NO: 1121, SEQ ID NO: 1122, SEQ ID NO: 1123, SEQ ID NO: 1124, SEQ ID NO: 1125, SEQ ID NO: 1126, SEQ ID NO: 1127, SEQ ID NO: 1128, SEQ ID NO: 1129, SEQ ID NO: 1130, SEQ ID NO: 1131, SEQ ID NO: 1132, SEQ ID NO: 1133, SEQ ID NO: 1134, SEQ ID NO: 1135, SEQ ID NO: 1136, SEQ ID NO: 1137, SEQ ID NO: 1138, SEQ ID NO: 1139, SEQ ID NO: 1140, SEQ ID NO: 1141, SEQ ID NO: 1142, SEQ ID NO: 1143, SEQ ID NO: 1144, SEQ ID NO: 1145, SEQ ID NO: 1146, SEQ ID NO: 1147, SEQ ID NO: 1148, SEQ ID NO: 1149, SEQ ID NO: 1150, SEQ ID NO: 1151, SEQ ID NO: 1152, SEQ ID NO: 1153, SEQ ID NO: 1154, SEQ ID NO: 1155, SEQ ID NO: 1156, SEQ ID NO: 1157, SEQ ID NO: 1158, SEQ ID NO: 1159, SEQ ID NO: 1160, SEQ ID NO: 1161, SEQ ID NO: 1162, SEQ ID NO: 1163, SEQ ID NO: 1164, SEQ ID NO: 1165, SEQ ID NO: 1166, SEQ ID NO: 1167, SEQ ID NO: 1168, SEQ ID NO: 1169, SEQ ID NO: 1170, SEQ ID NO: 1171, SEQ ID NO: 1172, SEQ ID NO: 1173, SEQ ID NO: 1174, SEQ ID NO: 1175, SEQ ID NO: 1176, SEQ ID NO: 1177, SEQ ID NO: 1178, SEQ ID NO: 1179, SEQ ID NO: 1180, SEQ ID NO: 1181, SEQ ID NO: 1182, SEQ ID NO: 1183, SEQ ID NO: 1184, SEQ ID NO: 1185, SEQ ID NO: 1186, SEQ ID NO: 1187, SEQ ID NO: 1188, SEQ ID NO: 1189, SEQ ID NO: 1190, SEQ ID NO: 1191, SEQ ID NO: 1192, SEQ ID NO: 1193, SEQ ID NO: 1194, SEQ ID NO: 1195, SEQ ID NO: 1196, SEQ ID NO: 1197, SEQ ID NO: 1198, SEQ ID NO: 1199, SEQ ID NO: 1200, SEQ ID NO: 1201, SEQ ID NO: 1202, SEQ ID NO: 1203, SEQ ID NO: 1204, SEQ ID NO: 1205, SEQ ID NO: 1206, SEQ ID NO: 1207, SEQ ID NO: 1208, SEQ ID NO: 1209, SEQ ID NO: 1210, SEQ ID NO: 1211, SEQ ID NO: 1212, SEQ ID NO: 1213, SEQ ID NO: 1214, SEQ ID NO: 1215, SEQ ID NO: 1216, SEQ ID NO: 1217 o SEQ ID NO: 1218".

"SEQ ID NOs: 1429-1442" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 1429, SEQ ID NO: 1430, SEQ ID NO: 1431, SEQ ID NO: 1432, SEQ ID NO: 1433, SEQ ID NO: 1434, SEQ ID NO: 1435, SEQ ID NO: 1436, SEQ ID NO: 1437, SEQ ID NO: 1438, SEQ ID NO: 1439, SEQ ID NO: 1440, SEQ ID NO: 1441 o SEQ ID NO: 1442".

"SEQ ID NOs: 1219-1428" se refiere a "una cualquiera de SEQ ID NO: 1219, SEQ ID NO: 1220, SEQ ID NO:

1221, SEQ ID NO: 1222, SEQ ID NO: 1223, SEQ ID NO: 1224, SEQ ID NO: 1225, SEQ ID NO: 1226, SEQ ID NO: 1227, SEQ ID NO: 1228, SEQ ID NO: 1229, SEQ ID NO: 1230, SEQ ID NO: 1231, SEQ ID NO: 1232, SEQ ID NO: 1233, SEQ ID NO: 1234, SEQ ID NO: 1235, SEQ ID NO: 1236, SEQ ID NO: 1237, SEQ ID NO: 1238, SEQ ID NO: 1239, SEQ ID NO: 1240, SEQ ID NO: 1241, SEQ ID NO: 1242, SEQ ID NO: 1243, SEQ ID NO: 1244, SEQ ID NO: 1245, SEQ ID NO: 1246, SEQ ID NO: 1247, SEQ ID NO: 1248, SEQ ID NO: 1249, SEQ ID NO: 1250, SEQ ID NO: 1251, SEQ ID NO: 1252, SEQ ID NO: 1253, SEQ ID NO: 1254, SEQ ID NO: 1255, SEQ ID NO: 1256, SEQ ID NO: 1257, SEQ ID NO: 1258, SEQ ID NO: 1259, SEQ ID NO: 1260, SEQ ID NO: 1261, SEQ ID NO: 1262, SEQ ID NO: 1263, SEQ ID NO: 1264, SEQ ID NO: 1265, SEQ ID NO: 1266, SEQ ID NO: 1267, SEQ ID NO: 1268, SEQ ID NO: 1269, SEQ ID NO: 1270, SEQ ID NO: 1271, SEQ ID NO: 1272, SEQ ID NO: 1273, SEQ ID NO: 1274, SEQ ID NO: 1275, SEQ ID NO: 1276, SEQ ID NO: 1277, SEQ ID NO: 1278, SEQ ID NO: 1279, SEQ ID NO: 1280, SEQ ID NO: 1281, SEQ ID NO: 1282, SEQ ID NO: 1283, SEQ ID NO: 1284, SEQ ID NO: 1285, SEQ ID NO: 1286, SEQ ID NO: 1287, SEQ ID NO: 1288, SEQ ID NO: 1289, SEQ ID NO: 1290, SEQ ID NO: 1291, SEQ ID NO: 1292, SEQ ID NO: 1293, SEQ ID NO: 1294, SEQ ID NO: 1295, SEQ ID NO: 1296, SEQ ID NO: 1297, SEQ ID NO: 1298, SEQ ID NO: 1299, SEQ ID NO: 1300, SEQ ID NO: 1301, SEQ ID NO: 1302, SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1304, SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1313, SEQ ID NO: 1314, SEQ ID NO: 1315, SEQ ID NO: 1316, SEQ ID NO: 1317, SEQ ID NO: 1318, SEQ ID NO: 1319, SEQ ID NO: 1320, SEQ ID NO: 1321, SEQ ID NO: 1322, SEQ ID NO: 1323, SEQ ID NO: 1324, SEQ ID NO: 1325, SEQ ID NO: 1326, SEQ ID NO: 1327, SEQ ID NO: 1328, SEQ ID NO: 1329, SEQ ID NO: 1330, SEQ ID NO: 1331, SEQ ID NO: 1332, SEQ ID NO: 1333, SEQ ID NO: 1334, SEQ ID NO: 1335, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1337, SEQ ID NO: 1338, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1340, SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342, SEQ ID NO: 1343, SEQ ID NO: 1344, SEQ ID NO: 1345, SEQ ID NO: 1346, SEQ ID NO: 1347, SEQ ID NO: 1348, SEQ ID NO: 1349, SEQ ID NO: 1350, SEQ ID NO: 1351, SEQ ID NO: 1352, SEQ ID NO: 1353, SEQ ID NO: 1354, SEQ ID NO: 1355, SEQ ID NO: 1356, SEQ ID NO: 1357, SEQ ID NO: 1358, SEQ ID NO: 1359, SEQ ID NO: 1360, SEQ ID NO: 1361, SEQ ID NO: 1362, SEQ ID NO: 1363, SEQ ID NO: 1364, SEQ ID NO: 1365, SEQ ID NO: 1366, SEQ ID NO: 1367, SEQ ID NO: 1368, SEQ ID NO: 1369, SEQ ID NO: 1370, SEQ ID NO: 1371, SEQ ID NO: 1372, SEQ ID NO: 1373, SEQ ID NO: 1374, SEQ ID NO: 1375, SEQ ID NO: 1376, SEQ ID NO: 1377, SEQ ID NO: 1378, SEQ ID NO: 1379, SEQ ID NO: 1380, SEQ ID NO: 1381, SEQ ID NO: 1382, SEQ ID NO: 1383, SEQ ID NO: 1384, SEQ ID NO: 1385, SEQ ID NO: 1386, SEQ ID NO: 1387, SEQ ID NO: 1388, SEQ ID NO: 1389, SEQ ID NO: 1390, SEQ ID NO: 1391, SEQ ID NO: 1392, SEQ ID NO: 1393, SEQ ID NO: 1394, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1396, SEQ ID NO: 1397, SEQ ID NO: 1398, SEQ ID NO: 1399, SEQ ID NO: 1400, SEQ ID NO: 1401, SEQ ID NO: 1402, SEQ ID NO: 1403, SEQ ID NO: 1404, SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, SEQ ID NO: 1408, SEQ ID NO: 1409, SEQ ID NO: 1410, SEQ ID NO: 1411, SEQ ID NO: 1412, SEQ ID NO: 1413, SEQ ID NO: 1414, SEQ ID NO: 1415, SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1418, SEQ ID NO: 1419, SEQ ID NO: 1420, SEQ ID NO: 1421, SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424, SEQ ID NO: 1425, SEQ ID NO: 1426, SEQ ID NO: 1427 o SEQ ID NO: 1428".

En algunos aspectos de la divulgación, una proteína F de RSV recombinante descrita puede incluir una secuencia de aminoácidos por lo menos 80 % (tal como por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 98 % o 100 %) idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 310, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 334, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 342, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 344,

SEQ ID NO: 345, SEQ ID NO: 346, SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 349, SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 371, SEQ ID NO: 372, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 374, SEQ ID NO: 375, SEQ ID NO: 376, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 378, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO: 390, SEQ ID NO: 391, SEQ ID NO: 392, SEQ ID NO: 393, SEQ ID NO: 394, SEQ ID NO: 395, SEQ ID NO: 396, SEQ ID NO: 397, SEQ ID NO: 398, SEQ ID NO: 399, SEQ ID NO: 400, SEQ ID NO: 401, SEQ ID NO: 402, SEQ ID NO: 403, SEQ ID NO: 404, SEQ ID NO: 405, SEQ ID NO: 406, SEQ ID NO: 407, SEQ ID NO: 408, SEQ ID NO: 409, SEQ ID NO: 410, SEQ ID NO: 411, SEQ ID NO: 412, SEQ ID NO: 413, SEQ ID NO: 414, SEQ ID NO: 415, SEQ ID NO: 416, SEQ ID NO: 417, SEQ ID NO: 418, SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 421, SEQ ID NO: 422, SEQ ID NO: 423, SEQ ID NO: 424, SEQ ID NO: 425, SEQ ID NO: 426, SEQ ID NO: 427, SEQ ID NO: 428, SEQ ID NO: 429, SEQ ID NO: 430, SEQ ID NO: 431, SEQ ID NO: 432, SEQ ID NO: 433, SEQ ID NO: 434, SEQ ID NO: 435, SEQ ID NO: 436, SEQ ID NO: 437, SEQ ID NO: 438, SEQ ID NO: 439, SEQ ID NO: 440, SEQ ID NO: 441, SEQ ID NO: 442, SEQ ID NO: 443, SEQ ID NO: 444, SEQ ID NO: 445, SEQ ID NO: 446, SEQ ID NO: 447, SEQ ID NO: 448, SEQ ID NO: 449, SEQ ID NO: 450, SEQ ID NO: 451, SEQ ID NO: 452, SEQ ID NO: 453, SEQ ID NO: 454, SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 457, SEQ ID NO: 458, SEQ ID NO: 459, SEQ ID NO: 460, SEQ ID NO: 461, SEQ ID NO: 462, SEQ ID NO: 463, SEQ ID NO: 464, SEQ ID NO: 465, SEQ ID NO: 466, SEQ ID NO: 467, SEQ ID NO: 468, SEQ ID NO: 469, SEQ ID NO: 470, SEQ ID NO: 471, SEQ ID NO: 472, SEQ ID NO: 473, SEQ ID NO: 474, SEQ ID NO: 475, SEQ ID NO: 476, SEQ ID NO: 477, SEQ ID NO: 478, SEQ ID NO: 479, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 481, SEQ ID NO: 482, SEQ ID NO: 483, SEQ ID NO: 484, SEQ ID NO: 485, SEQ ID NO: 486, SEQ ID NO: 487, SEQ ID NO: 488, SEQ ID NO: 489, SEQ ID NO: 490, SEQ ID NO: 491, SEQ ID NO: 492, SEQ ID NO: 493, SEQ ID NO: 494, SEQ ID NO: 495, SEQ ID NO: 496, SEQ ID NO: 497, SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 499, SEQ ID NO: 500, SEQ ID NO: 501, SEQ ID NO: 502, SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 504, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 508, SEQ ID NO: 509, SEQ ID NO: 510, SEQ ID NO: 511, SEQ ID NO: 512, SEQ ID NO: 513, SEQ ID NO: 514, SEQ ID NO: 515, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 517, SEQ ID NO: 518, SEQ ID NO: 519, SEQ ID NO: 520, SEQ ID NO: 521, SEQ ID NO: 522, SEQ ID NO: 523, SEQ ID NO: 524, SEQ ID NO: 525, SEQ ID NO: 526, SEQ ID NO: 527, SEQ ID NO: 528, SEQ ID NO: 529, SEQ ID NO: 530, SEQ ID NO: 531, SEQ ID NO: 532, SEQ ID NO: 533, SEQ ID NO: 534, SEQ ID NO: 535, SEQ ID NO: 536, SEQ ID NO: 537, SEQ ID NO: 538, SEQ ID NO: 539, SEQ ID NO: 540, SEQ ID NO: 541, SEQ ID NO: 542, SEQ ID NO: 543, SEQ ID NO: 544, SEQ ID NO: 545, SEQ ID NO: 546, SEQ ID NO: 547, SEQ ID NO: 548, SEQ ID NO: 549, SEQ ID NO: 550, SEQ ID NO: 551, SEQ ID NO: 552, SEQ ID NO: 553, SEQ ID NO: 554, SEQ ID NO: 555, SEQ ID NO: 556, SEQ ID NO: 557, SEQ ID NO: 558, SEQ ID NO: 559, SEQ ID NO: 560, SEQ ID NO: 561, SEQ ID NO: 562, SEQ ID NO: 563, SEQ ID NO: 564, SEQ ID NO: 565, SEQ ID NO: 566, SEQ ID NO: 567, SEQ ID NO: 568, SEQ ID NO: 569, SEQ ID NO: 570, SEQ ID NO: 571, SEQ ID NO: 572, SEQ ID NO: 573, SEQ ID NO: 574, SEQ ID NO: 575, SEQ ID NO: 576, SEQ ID NO: 577, SEQ ID NO: 578, SEQ ID NO: 579, SEQ ID NO: 580, SEQ ID NO: 581, SEQ ID NO: 582, SEQ ID NO: 583, SEQ ID NO: 584, SEQ ID NO: 585, SEQ ID NO: 586, SEQ ID NO: 587, SEQ ID NO: 588, SEQ ID NO: 589, SEQ ID NO: 590, SEQ ID NO: 591, SEQ ID NO: 592, SEQ ID NO: 593, SEQ ID NO: 594, SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 596, SEQ ID NO: 597, SEQ ID NO: 598, SEQ ID NO: 599, SEQ ID NO: 600, SEQ ID NO: 601, SEQ ID NO: 602, SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604, SEQ ID NO: 605, SEQ ID NO: 606, SEQ ID NO: 607, SEQ ID NO: 608, SEQ ID NO: 609, SEQ ID NO: 610, SEQ ID NO: 611, SEQ ID NO: 612, SEQ ID NO: 613, SEQ ID NO: 614, SEQ ID NO: 615, SEQ ID NO: 616, SEQ ID NO: 617, SEQ ID NO: 618, SEQ ID NO: 619, SEQ ID NO: 620, SEQ ID NO: 621, SEQ ID NO: 622, SEQ ID NO: 623, SEQ ID NO: 624, SEQ ID NO: 625, SEQ ID NO: 626, SEQ ID NO: 627, SEQ ID NO: 628, SEQ ID NO: 629, SEQ ID NO: 630, SEQ ID NO: 631, SEQ ID NO: 632, SEQ ID NO: 633, SEQ ID NO: 634, SEQ ID NO: 635, SEQ ID NO: 636, SEQ ID NO: 637, SEQ ID NO: 638, SEQ ID NO: 639, SEQ ID NO: 640, SEQ ID NO: 641, SEQ ID NO: 642, SEQ ID NO: 643, SEQ ID NO: 644, SEQ ID NO: 645, SEQ ID NO: 646, SEQ ID NO: 647, SEQ ID NO: 648, SEQ ID NO: 649, SEQ ID NO: 650, SEQ ID NO: 651, SEQ ID NO: 652, SEQ ID NO: 653, SEQ ID NO: 654, SEQ ID NO: 655, SEQ ID NO: 656, SEQ ID NO: 657, SEQ ID NO: 658, SEQ ID NO: 659, SEQ ID NO: 660, SEQ ID NO: 661, SEQ ID NO: 662, SEQ ID NO: 663, SEQ ID NO: 664, SEQ ID NO: 665, SEQ ID NO: 666, SEQ ID NO: 667, SEQ ID NO: 668, SEQ ID NO: 669, SEQ ID NO: 670, SEQ ID NO: 671, SEQ ID NO: 672, SEQ ID NO: 673, SEQ ID NO: 674, SEQ ID NO: 675, SEQ ID NO: 676, SEQ ID NO: 677, SEQ ID NO: 678, SEQ ID NO: 679, SEQ ID NO: 680, SEQ ID NO: 681, SEQ ID NO: 682, SEQ ID NO: 683, SEQ ID NO: 684, SEQ ID NO: 685, SEQ ID NO: 686, SEQ ID NO: 687, SEQ ID NO: 688, SEQ ID NO: 689, SEQ ID NO: 690, SEQ ID NO: 691, SEQ ID NO: 692, SEQ ID NO: 693, SEQ ID NO: 698, SEQ ID NO: 699, SEQ ID NO: 700, SEQ ID NO: 701, SEQ ID NO: 702, SEQ ID NO: 703, SEQ ID NO: 704, SEQ ID NO: 705, SEQ ID NO: 706, SEQ ID NO: 707, SEQ ID NO: 708, SEQ ID NO: 709, SEQ ID NO: 710, SEQ ID NO: 711, SEQ ID NO: 712, SEQ ID NO: 713, SEQ ID NO: 714, SEQ ID NO: 715, SEQ ID NO: 716, SEQ ID NO: 717, SEQ ID NO: 718, SEQ ID NO: 719, SEQ ID NO: 720, SEQ ID NO: 721, SEQ ID NO: 722, SEQ ID NO: 723, SEQ ID NO: 724, SEQ ID NO: 725, SEQ ID NO: 726, SEQ ID NO: 727, SEQ ID NO: 728, SEQ ID NO: 729, SEQ ID NO: 730, SEQ ID NO: 731, SEQ ID NO: 732, SEQ ID NO: 733, SEQ ID NO: 734, SEQ ID NO: 735, SEQ ID NO: 736, SEQ ID NO: 737, SEQ ID NO: 738, SEQ ID NO: 739, SEQ ID NO: 740, SEQ ID NO: 741, SEQ ID NO: 742, SEQ ID NO: 743, SEQ ID NO: 744, SEQ ID NO: 745, SEQ ID NO: 746, SEQ ID NO: 747, SEQ ID NO: 748, SEQ ID NO: 749, SEQ ID NO: 750, SEQ ID NO: 751, SEQ ID NO: 752, SEQ ID NO: 753, SEQ ID NO: 754, SEQ ID NO: 755, SEQ ID NO: 756, SEQ ID NO: 757, SEQ ID NO: 758, SEQ ID NO: 759, SEQ ID NO: 760, SEQ ID NO: 761, SEQ ID NO: 762, SEQ ID NO: 763, SEQ ID NO: 764, SEQ ID NO: 765, SEQ ID NO: 766, SEQ ID NO: 767, SEQ ID NO: 768, SEQ ID NO: 769, SEQ ID NO: 770, SEQ ID NO: 771, SEQ ID NO: 772, SEQ ID NO: 773, SEQ ID NO: 774, SEQ ID NO: 775, SEQ ID NO: 776, SEQ ID NO: 777, SEQ ID NO: 778, SEQ ID NO: 779, SEQ ID NO: 780, SEQ ID NO: 781, SEQ ID NO: 782, SEQ ID NO: 783, SEQ ID NO: 784, SEQ ID NO: 785, SEQ ID NO: 786, SEQ ID NO: 787, SEQ ID

NO: 788, SEQ ID NO: 789, SEQ ID NO: 790, SEQ ID NO: 791, SEQ ID NO: 792, SEQ ID NO: 793, SEQ ID NO: 794, SEQ ID NO: 795, SEQ ID NO: 796, SEQ ID NO: 797, SEQ ID NO: 798, SEQ ID NO: 799, SEQ ID NO: 800, SEQ ID NO: 801, SEQ ID NO: 802, SEQ ID NO: 803, SEQ ID NO: 804, SEQ ID NO: 805, SEQ ID NO: 806, SEQ ID NO: 807, SEQ ID NO: 808, SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813, SEQ ID NO: 814, SEQ ID NO: 815, SEQ ID NO: 816, SEQ ID NO: 817, SEQ ID NO: 818, SEQ ID NO: 819, SEQ ID NO: 820, SEQ ID NO: 821, SEQ ID NO: 822, SEQ ID NO: 823, SEQ ID NO: 824, SEQ ID NO: 825, SEQ ID NO: 826, SEQ ID NO: 827, SEQ ID NO: 828, SEQ ID NO: 829, SEQ ID NO: 830, SEQ ID NO: 831, SEQ ID NO: 832, SEQ ID NO: 833, SEQ ID NO: 834, SEQ ID NO: 835, SEQ ID NO: 836, SEQ ID NO: 837, SEQ ID NO: 838, SEQ ID NO: 839, SEQ ID NO: 840, SEQ ID NO: 841, SEQ ID NO: 842, SEQ ID NO: 843, SEQ ID NO: 844, SEQ ID NO: 845, SEQ ID NO: 846, SEQ ID NO: 847, SEQ ID NO: 848, SEQ ID NO: 849, SEQ ID NO: 850, SEQ ID NO: 851, SEQ ID NO: 852, SEQ ID NO: 853, SEQ ID NO: 854, SEQ ID NO: 855, SEQ ID NO: 856, SEQ ID NO: 857, SEQ ID NO: 858, SEQ ID NO: 859, SEQ ID NO: 860, SEQ ID NO: 861, SEQ ID NO: 862, SEQ ID NO: 863, SEQ ID NO: 864, SEQ ID NO: 865, SEQ ID NO: 866, SEQ ID NO: 867, SEQ ID NO: 868, SEQ ID NO: 869, SEQ ID NO: 870, SEQ ID NO: 871, SEQ ID NO: 872, SEQ ID NO: 873, SEQ ID NO: 874, SEQ ID NO: 875, SEQ ID NO: 876, SEQ ID NO: 877, SEQ ID NO: 878, SEQ ID NO: 879, SEQ ID NO: 880, SEQ ID NO: 881, SEQ ID NO: 882, SEQ ID NO: 883, SEQ ID NO: 884, SEQ ID NO: 885, SEQ ID NO: 886, SEQ ID NO: 887, SEQ ID NO: 888, SEQ ID NO: 889, SEQ ID NO: 890, SEQ ID NO: 891, SEQ ID NO: 892, SEQ ID NO: 893, SEQ ID NO: 894, SEQ ID NO: 895, SEQ ID NO: 896, SEQ ID NO: 897, SEQ ID NO: 898, SEQ ID NO: 899, SEQ ID NO: 900, SEQ ID NO: 901, SEQ ID NO: 902, SEQ ID NO: 903, SEQ ID NO: 904, SEQ ID NO: 905, SEQ ID NO: 906, SEQ ID NO: 907, SEQ ID NO: 908, SEQ ID NO: 909, SEQ ID NO: 910, SEQ ID NO: 911, SEQ ID NO: 912, SEQ ID NO: 913, SEQ ID NO: 914, SEQ ID NO: 915, SEQ ID NO: 916, SEQ ID NO: 917, SEQ ID NO: 918, SEQ ID NO: 919, SEQ ID NO: 920, SEQ ID NO: 921, SEQ ID NO: 922, SEQ ID NO: 923, SEQ ID NO: 924, SEQ ID NO: 925, SEQ ID NO: 926, SEQ ID NO: 927, SEQ ID NO: 928, SEQ ID NO: 929, SEQ ID NO: 930, SEQ ID NO: 931, SEQ ID NO: 932, SEQ ID NO: 933, SEQ ID NO: 934, SEQ ID NO: 935, SEQ ID NO: 936, SEQ ID NO: 937, SEQ ID NO: 938, SEQ ID NO: 939, SEQ ID NO: 940, SEQ ID NO: 941, SEQ ID NO: 942, SEQ ID NO: 943, SEQ ID NO: 944, SEQ ID NO: 945, SEQ ID NO: 946, SEQ ID NO: 947, SEQ ID NO: 948, SEQ ID NO: 949, SEQ ID NO: 950, SEQ ID NO: 951, SEQ ID NO: 952, SEQ ID NO: 953, SEQ ID NO: 954, SEQ ID NO: 955, SEQ ID NO: 956, SEQ ID NO: 957, SEQ ID NO: 958, SEQ ID NO: 959, SEQ ID NO: 960, SEQ ID NO: 961, SEQ ID NO: 962, SEQ ID NO: 963, SEQ ID NO: 964, SEQ ID NO: 965, SEQ ID NO: 966, SEQ ID NO: 967, SEQ ID NO: 968, SEQ ID NO: 969, SEQ ID NO: 970, SEQ ID NO: 971, SEQ ID NO: 972, SEQ ID NO: 973, SEQ ID NO: 974, SEQ ID NO: 975, SEQ ID NO: 976, SEQ ID NO: 977, SEQ ID NO: 978, SEQ ID NO: 979, SEQ ID NO: 980, SEQ ID NO: 981, SEQ ID NO: 982, SEQ ID NO: 983, SEQ ID NO: 984, SEQ ID NO: 985, SEQ ID NO: 986, SEQ ID NO: 987, SEQ ID NO: 988, SEQ ID NO: 989, SEQ ID NO: 990, SEQ ID NO: 991, SEQ ID NO: 992, SEQ ID NO: 993, SEQ ID NO: 994, SEQ ID NO: 995, SEQ ID NO: 996, SEQ ID NO: 997, SEQ ID NO: 998, SEQ ID NO: 999, SEQ ID NO: 1000, SEQ ID NO: 1001, SEQ ID NO: 1002, SEQ ID NO: 1003, SEQ ID NO: 1004, SEQ ID NO: 1005, SEQ ID NO: 1006, SEQ ID NO: 1007, SEQ ID NO: 1008, SEQ ID NO: 1009, SEQ ID NO: 1010, SEQ ID NO: 1011, SEQ ID NO: 1012, SEQ ID NO: 1013, SEQ ID NO: 1014, SEQ ID NO: 1015, SEQ ID NO: 1016, SEQ ID NO: 1017, SEQ ID NO: 1018, SEQ ID NO: 1019, SEQ ID NO: 1020, SEQ ID NO: 1021, SEQ ID NO: 1022, SEQ ID NO: 1023, SEQ ID NO: 1024, SEQ ID NO: 1025, SEQ ID NO: 1026, SEQ ID NO: 1027, SEQ ID NO: 1028, SEQ ID NO: 1029, SEQ ID NO: 1030, SEQ ID NO: 1031, SEQ ID NO: 1032, SEQ ID NO: 1033, SEQ ID NO: 1034, SEQ ID NO: 1035, SEQ ID NO: 1036, SEQ ID NO: 1037, SEQ ID NO: 1038, SEQ ID NO: 1039, SEQ ID NO: 1040, SEQ ID NO: 1041, SEQ ID NO: 1042, SEQ ID NO: 1043, SEQ ID NO: 1044, SEQ ID NO: 1045, SEQ ID NO: 1046, SEQ ID NO: 1047, SEQ ID NO: 1048, SEQ ID NO: 1049, SEQ ID NO: 1050, SEQ ID NO: 1051, SEQ ID NO: 1052, SEQ ID NO: 1053, SEQ ID NO: 1054, SEQ ID NO: 1055, SEQ ID NO: 1056, SEQ ID NO: 1057, SEQ ID NO: 1058, SEQ ID NO: 1059, SEQ ID NO: 1060, SEQ ID NO: 1061, SEQ ID NO: 1062, SEQ ID NO: 1063, SEQ ID NO: 1064, SEQ ID NO: 1065, SEQ ID NO: 1066, SEQ ID NO: 1067, SEQ ID NO: 1068, SEQ ID NO: 1069, SEQ ID NO: 1070, SEQ ID NO: 1071, SEQ ID NO: 1072, SEQ ID NO: 1073, SEQ ID NO: 1074, SEQ ID NO: 1075, SEQ ID NO: 1076, SEQ ID NO: 1077, SEQ ID NO: 1078, SEQ ID NO: 1079, SEQ ID NO: 1080, SEQ ID NO: 1081, SEQ ID NO: 1082, SEQ ID NO: 1083, SEQ ID NO: 1084, SEQ ID NO: 1085, SEQ ID NO: 1086, SEQ ID NO: 1087, SEQ ID NO: 1088, SEQ ID NO: 1099, SEQ ID NO: 1100, SEQ ID NO: 1101, SEQ ID NO: 1102, SEQ ID NO: 1103, SEQ ID NO: 1104, SEQ ID NO: 1105, SEQ ID NO: 1106, SEQ ID NO: 1107, SEQ ID NO: 1108, SEQ ID NO: 1109, SEQ ID NO: 1110, SEQ ID NO: 1111, SEQ ID NO: 1112, SEQ ID NO: 1113, SEQ ID NO: 1114, SEQ ID NO: 1115, SEQ ID NO: 1116, SEQ ID NO: 1117, SEQ ID NO: 1118, SEQ ID NO: 1119, SEQ ID NO: 1120, SEQ ID NO: 1121, SEQ ID NO: 1122, SEQ ID NO: 1123, SEQ ID NO: 1124, SEQ ID NO: 1125, SEQ ID NO: 1126, SEQ ID NO: 1127, SEQ ID NO: 1128, SEQ ID NO: 1129, SEQ ID NO: 1130, SEQ ID NO: 1131, SEQ ID NO: 1132, SEQ ID NO: 1133, SEQ ID NO: 1134, SEQ ID NO: 1135, SEQ ID NO: 1136, SEQ ID NO: 1137, SEQ ID NO: 1138, SEQ ID NO: 1139, SEQ ID NO: 1140, SEQ ID NO: 1141, SEQ ID NO: 1142, SEQ ID NO: 1143, SEQ ID NO: 1144, SEQ ID NO: 1145, SEQ ID NO: 1146, SEQ ID NO: 1147, SEQ ID NO: 1148, SEQ ID NO: 1149, SEQ ID NO: 1150, SEQ ID NO: 1151, SEQ ID NO: 1152, SEQ ID NO: 1153, SEQ ID NO: 1154, SEQ ID NO: 1155, SEQ ID NO: 1156, SEQ ID NO: 1157, SEQ ID NO: 1158, SEQ ID NO: 1159, SEQ ID NO: 1160, SEQ ID NO: 1161, SEQ ID NO: 1162, SEQ ID NO: 1163, SEQ ID NO: 1164, SEQ ID NO: 1165, SEQ ID NO: 1166, SEQ ID NO: 1167, SEQ ID NO: 1168, SEQ ID NO: 1169, SEQ ID NO: 1170, SEQ ID NO: 1171, SEQ ID NO: 1172, SEQ ID NO: 1173, SEQ ID NO: 1174, SEQ ID NO: 1175, SEQ ID NO: 1176, SEQ ID NO: 1177, SEQ ID NO: 1178, SEQ ID NO: 1179, SEQ ID NO: 1180, SEQ ID NO: 1181, SEQ ID NO: 1182, SEQ ID NO: 1183, SEQ ID NO: 1184, SEQ ID NO: 1185, SEQ ID NO: 1186, SEQ ID NO: 1187, SEQ ID NO: 1188, SEQ ID NO: 1189, SEQ ID NO: 1190, SEQ ID NO: 1191, SEQ ID NO: 1192, SEQ ID NO: 1193, SEQ ID NO: 1194,

SEQ ID NO: 1195, SEQ ID NO: 1196, SEQ ID NO: 1197, SEQ ID NO: 1198, SEQ ID NO: 1199, SEQ ID NO: 1200, SEQ ID NO: 1201, SEQ ID NO: 1202, SEQ ID NO: 1203, SEQ ID NO: 1204, SEQ ID NO: 1205, SEQ ID NO: 1206, SEQ ID NO: 1207, SEQ ID NO: 1208, SEQ ID NO: 1209, SEQ ID NO: 1210, SEQ ID NO: 1211, SEQ ID NO: 1212, SEQ ID NO: 1213, SEQ ID NO: 1214, SEQ ID NO: 1215, SEQ ID NO: 1216, SEQ ID NO: 1217, SEQ ID NO: 1218, SEQ ID NO: 1219, SEQ ID NO: 1220, SEQ ID NO: 1221, SEQ ID NO: 1222, SEQ ID NO: 1223, SEQ ID NO: 1224, SEQ ID NO: 1225, SEQ ID NO: 1226, SEQ ID NO: 1227, SEQ ID NO: 1228, SEQ ID NO: 1229, SEQ ID NO: 1230, SEQ ID NO: 1231, SEQ ID NO: 1232, SEQ ID NO: 1233, SEQ ID NO: 1234, SEQ ID NO: 1235, SEQ ID NO: 1236, SEQ ID NO: 1237, SEQ ID NO: 1238, SEQ ID NO: 1239, SEQ ID NO: 1240, SEQ ID NO: 1241, SEQ ID NO: 1242, SEQ ID NO: 1243, SEQ ID NO: 1244, SEQ ID NO: 1245, SEQ ID NO: 1246, SEQ ID NO: 1247, SEQ ID NO: 1248, SEQ ID NO: 1249, SEQ ID NO: 1250, SEQ ID NO: 1251, SEQ ID NO: 1252, SEQ ID NO: 1253, SEQ ID NO: 1254, SEQ ID NO: 1255, SEQ ID NO: 1256, SEQ ID NO: 1257, SEQ ID NO: 1258, SEQ ID NO: 1259, SEQ ID NO: 1260, SEQ ID NO: 1261, SEQ ID NO: 1262, SEQ ID NO: 1263, SEQ ID NO: 1264, SEQ ID NO: 1265, SEQ ID NO: 1266, SEQ ID NO: 1267, SEQ ID NO: 1268, SEQ ID NO: 1269, SEQ ID NO: 1270, SEQ ID NO: 1271, SEQ ID NO: 1272, SEQ ID NO: 1273, SEQ ID NO: 1274, SEQ ID NO: 1275, SEQ ID NO: 1276, SEQ ID NO: 1277, SEQ ID NO: 1278, SEQ ID NO: 1279, SEQ ID NO: 1280, SEQ ID NO: 1281, SEQ ID NO: 1282, SEQ ID NO: 1283, SEQ ID NO: 1284, SEQ ID NO: 1285, SEQ ID NO: 1286, SEQ ID NO: 1287, SEQ ID NO: 1288, SEQ ID NO: 1289, SEQ ID NO: 1290, SEQ ID NO: 1291, SEQ ID NO: 1292, SEQ ID NO: 1293, SEQ ID NO: 1294, SEQ ID NO: 1295, SEQ ID NO: 1296, SEQ ID NO: 1297, SEQ ID NO: 1298, SEQ ID NO: 1299, SEQ ID NO: 1300, SEQ ID NO: 1301, SEQ ID NO: 1302, SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1304, SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1313, SEQ ID NO: 1314, SEQ ID NO: 1315, SEQ ID NO: 1316, SEQ ID NO: 1317, SEQ ID NO: 1318, SEQ ID NO: 1319, SEQ ID NO: 1320, SEQ ID NO: 1321, SEQ ID NO: 1322, SEQ ID NO: 1323, SEQ ID NO: 1324, SEQ ID NO: 1325, SEQ ID NO: 1326, SEQ ID NO: 1327, SEQ ID NO: 1328, SEQ ID NO: 1329, SEQ ID NO: 1330, SEQ ID NO: 1331, SEQ ID NO: 1332, SEQ ID NO: 1333, SEQ ID NO: 1334, SEQ ID NO: 1335, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1337, SEQ ID NO: 1338, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1340, SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342, SEQ ID NO: 1343, SEQ ID NO: 1344, SEQ ID NO: 1345, SEQ ID NO: 1346, SEQ ID NO: 1347, SEQ ID NO: 1348, SEQ ID NO: 1349, SEQ ID NO: 1350, SEQ ID NO: 1351, SEQ ID NO: 1352, SEQ ID NO: 1353, SEQ ID NO: 1354, SEQ ID NO: 1355, SEQ ID NO: 1356, SEQ ID NO: 1357, SEQ ID NO: 1358, SEQ ID NO: 1359, SEQ ID NO: 1360, SEQ ID NO: 1361, SEQ ID NO: 1362, SEQ ID NO: 1363, SEQ ID NO: 1364, SEQ ID NO: 1365, SEQ ID NO: 1366, SEQ ID NO: 1367, SEQ ID NO: 1368, SEQ ID NO: 1369, SEQ ID NO: 1370, SEQ ID NO: 1371, SEQ ID NO: 1372, SEQ ID NO: 1373, SEQ ID NO: 1374, SEQ ID NO: 1375, SEQ ID NO: 1376, SEQ ID NO: 1377, SEQ ID NO: 1378, SEQ ID NO: 1379, SEQ ID NO: 1380, SEQ ID NO: 1381, SEQ ID NO: 1382, SEQ ID NO: 1383, SEQ ID NO: 1384, SEQ ID NO: 1385, SEQ ID NO: 1386, SEQ ID NO: 1387, SEQ ID NO: 1388, SEQ ID NO: 1389, SEQ ID NO: 1390, SEQ ID NO: 1391, SEQ ID NO: 1392, SEQ ID NO: 1393, SEQ ID NO: 1394, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1396, SEQ ID NO: 1397, SEQ ID NO: 1398, SEQ ID NO: 1399, SEQ ID NO: 1400, SEQ ID NO: 1401, SEQ ID NO: 1402, SEQ ID NO: 1403, SEQ ID NO: 1404, SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, SEQ ID NO: 1408, SEQ ID NO: 1409, SEQ ID NO: 1410, SEQ ID NO: 1411, SEQ ID NO: 1412, SEQ ID NO: 1413, SEQ ID NO: 1414, SEQ ID NO: 1415, SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1418, SEQ ID NO: 1419, SEQ ID NO: 1420, SEQ ID NO: 1421, SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424, SEQ ID NO: 1425, SEQ ID NO: 1426, SEQ ID NO: 1427, SEQ ID NO: 1428, SEQ ID NO: 1429, SEQ ID NO: 1430, SEQ ID NO: 1431, SEQ ID NO: 1432, SEQ ID NO: 1433, SEQ ID NO: 1434, SEQ ID NO: 1435, SEQ ID NO: 1436, SEQ ID NO: 1437, SEQ ID NO: 1438, SEQ ID NO: 1439, SEQ ID NO: 1440, SEQ ID NO: 1441, SEQ ID NO: 1442, SEQ ID NO: 1456, SEQ ID NO: 1457, SEQ ID NO: 1458, SEQ ID NO: 1459, SEQ ID NO: 1460, SEQ ID NO: 1461, SEQ ID NO: 1462, SEQ ID NO: 1463, SEQ ID NO: 1464, SEQ ID NO: 1465, SEQ ID NO: 1466, SEQ ID NO: 1467, SEQ ID NO: 1468, SEQ ID NO: 1474, SEQ ID NO: 1475, SEQ ID NO: 1476, SEQ ID NO: 1477 o SEQ ID NO: 1478 ("conjunto de secuencias F"), en donde el polipéptido F de RSV recombinante específicamente se une a un anticuerpo específico de prefusión de F de RSV (tal como D25) y/o incluye un sitio antigénico específico de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). En varias realizaciones, el inmunógeno específicamente se une al anticuerpo o incluye el sitio antigénico después de la incubación en PBS a pH 7.4 a 20 °C durante 24 horas. En algunas realizaciones, el polipéptido F de RSV recombinante incluye una de las secuencias del conjunto de secuencias F y, además, incluye hasta 20 (tal como hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) sustituciones de aminoácidos (tales como sustituciones de aminoácido conservativas, en donde el polipéptido F de RSV recombinante específicamente se une a un anticuerpo específico de prefusión de F de RSV (tal como D25) y/o incluye un sitio antigénico específico de prefusión de F de RSV (tal como el sitio antigénico Ø). La persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que las secuencias arriba enumeradas pueden incluir secuencias conductoras, etiquetas de purificación, sitios de escisión de proteasa para eliminar dominios de trimerización de etiquetas de purificación, dominios de subunidad de nanopartícula de proteína u otras secuencias que no están relacionadas con la proteína F de RSV recombinante. En varias realizaciones, un inmunógeno proporcionado en la presente incluye una proteína F de RSV recombinante de una de las secuencias anteriores pero no incluye las secuencias conductoras, etiquetas de purificación, sitios de escisión de proteasa para eliminar los dominios de trimerización de etiquetas de purificación, dominios de subunidad de nanopartícula de proteína u otras secuencias que no están relacionadas con la proteína F de RSV recombinante. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican estas secuencias de proteína, así como los métodos para utilizar las proteínas F de RSV recombinantes para generar una respuesta inmune al RSV en un sujeto, o para prevenir o tratar la infección de RSV en un sujeto.

III. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar características particulares de determinadas realizaciones, pero el alcance de las reivindicaciones no debe limitarse a esas características ejemplificadas.

Ejemplo 1

Estructrura del Trímero F de Prefusión del Virus Sincitial Respiratorio Unido a un Anticuerpo Humano

La conformación de prefusión de la glicoproteína de fusión (F) del virus sincitial respiratorio (RSV) es el objetivo de la mayoría de los anticuerpos neutralizantes de RSV en el suero humano, pero su metaestabilidad ha impedido la caracterización. Para superar este obstáculo, se identificaron los anticuerpos que no unen la conformación de postfusión de F y son > 10 veces más potentes que el anticuerpo profiláctico palivizumab (Synagis®). La estructura de co-cristal para uno de estos anticuerpos, D25, en complejo con la glicoproteína F revela que D25 bloquea F en su estado de prefusión. Las comparaciones de las conformaciones de prefusión y de postfusión F definen los reordenamientos requeridos para mediar en la entrada de RSV. La estructura de la glicoproteína D25-F revela un nuevo sitio de vulnerabilidad, el sitio antigénico Ø, en la parte superior de la glicoproteína F que es el carácter específico de prefusión y cuaternario. La estructura del trímero F de RSV de prefusión, junto con la definición de sitio antigénico Ø, debe permitir el diseño de antígenos de vacuna mejorados y guiar nuevos enfoques para la prevención pasiva de la enfermedad inducida por RSV.

El virus sincitial respiratorio (RSV) es ubicuo, infectyo casi a todos los niños de 3 años (Glezen *et al., Am. J. Dis. Child.,* 140, 543 (1986)). En los Estados Unidos, la bronquiolitis por RSV es la causa principal de hospitalización en niños y una causa principal de asma y sibilancias por toda la infancia (Shay *et al., JAMA,* 282, 1440 (1999); Hall *et al., N. Engl. J. Med.,* 360, 588 (2009)). Globalmente, el RSV es el responsable de 66.000-199.000 muertes cada año para niños menores de cinco años (Nair *et al., Lancet,* 375, 1545 (2010)), y representa el 7 % de las muertes entre los niños de 1 mes a 1 año de edad - más que cualquier otro patógeno único excepto la malaria (Lozano *et al., Lancet,* 380, 2095 (2013)). La única intervención disponible es la administración pasiva del anticuerpo monoclonal con licencia palivizumab (Synagis®), que reconoce la glicoproteína de fusión (F) de RSV (Johnson *et al., J. Infect. Dis.,* 176, 1215 (1997); Beeler y van Wyke Coelingh, *J. Virol.,* 63, 2941 (1989)) y reduce la incidencia de la enfermedad grave (The IMpact-RSV Study Group, *Pediatrics,* 102, 531 (1998)). La evidencia clínica de que los anticuerpos específicos de F de RSV pueden proteger frente a la enfermedad ha apresurado a una búsqueda de mejores anticuerpos (Collarini *et al., J. Immunol.,* 183, 6338 (2009); Wu *et al., J. Mol. Biol.,* 368, 652 (2007); Kwakkenbos *et al., Nat. Med.,* 16, 123 (2010)) y un esfuerzo concertado para desarrollar una vacuna eficaz (Graham, *Immunol. Rev.,* 239, 149 (2011)).

La glicoproteína F de RSV facilita la fusión de las membranas virales y celulares (Walsh y Hruska, *J. Virol*, 47, 171 (1983)); es una proteína de fusión tipo I, con una conformación de prefusión metaestable que almacena energía de plegamiento, liberada durante un reordenamiento estructural a una conformación de postfusión altamente estable. Se ha encontrado que tres sitios antigénicos (I, II y IV) inducen la actividad neutralizante (*Arbiza et al., J. Gen. Virol.,* 73, 2225 (1992); Lopez *et al., J. Virol.,* 72, 6922 (1998); Lopez *et al., J. Virol.,* 64, 927 (1990)), y todos existen en la forma de postfusión de F como se determina por estudios estructurales y biofísicos (McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011); Swanson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 108, 9619 (2011)). La absorción de sueros humanos con F de postfusión, sin embargo, no logra eliminar la mayoría de la actividad neutralizante específica de F, sugiriendo que la forma de prefusión puede albergar sitios antigénicos neutralizantes novedosos (Magro *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 109, 3089 (2012)). A pesar del esfuerzo intensivo, no se ha obtenido una preparación homogénea de F de RSV de prefusión soluble. Por lo tanto, la determinación de la estructura de la F de prefusión y la identificación de sitios antigénicos específicos de F novedosos han llegado a ser prioridades convergentes para el desarrollo de nuevos anticuerpos y vacunas profilácticos y terapéuticos. En línea con estos objetivos, se identificaron los anticuerpos específicos de F que podrían neutralizar RSV, pero no se unen a la F de postfusión y se definió la estructura de la F de RSV reconocida por estos anticuerpos. Los resultados revelan la conformación de prefusión de F de RSV, el mecanismo de neutralización para una categoría de anticuerpos notablemente potentes, y detalles a nivel atómico para un sitio antigénico específico de prefusión que debe servir como una diana de terapias basadas en anticuerpos mejoradas y proporcionar una base para el desarrollo de antígenos de vacuna eficaces.

Se determinó que dos anticuerpos humanos—D25 y AM22— son ~ 50 veces más potentes que palivizumab (FIG. 1A) para neutralizar F de RSV, y que tampoco se unen a una forma soluble de F de RSV estabilizada en la conformación de postfusión (McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011)) (FIG. 1B). D25 y AM22 se describieron previamente (Kwakkenbos *et al., Nat. Med.,* 16, 123 (2010); Publicación de Patente de los Estados Unidos 2010/0239593; Publicación de Patente de los Estados Unidos 2012/0070446). La carencia de la unión de D25 y AM22 a la forma de posfusión de F de RSV sugirió que estos anticuerpos podrían reconocer la conformación de prefusión metaestable.

Los esfuerzos estructurales se enfocaron en los anticuerpos humanos, AM22 y D25. Se utilizó un formato de

expresión de placa de microtítulación de 96 pocillos (Pancera *et al.,* PLoS One. 2013;8(2):e55701, 2013) para detectar la unión de estos anticuerpos a un panel de variantes de glicoproteína F de RSV que se capturaron de los sobrenadantes de células en placas ELISA Ni^{2+}-NTA. Se testó la unión del anticuerpo a un construcción de glicoproteína F (RSV F(+) Fd), que comprende los residuos1-513 de F de RSV condensados a un dominio de trimerización de fibritina C-terminal (Frank *et al.,* J. *Mol. Biol.,* 308, 1081 (2001)). Sin embargo, los complejos no se formaron al mezclar Fd F(+) de RSV purificado con el anticuerpo D25 o AM22 purificado. Se determinó que la purificación de la glicoproteína F soluble activó el estado de prefusión metaestable (Chaiwatpongsakorn *et al., J. Virol.,* 85, 3968 (2011)); para superar esta inestabilidad, las células que expresan Fd F(+) de RSV se incubaron con fragmentos de unión a antígenos (Fabs) o inmunoglobulinas (estas últimas, con un sitio de escisión de proteasa HRV3C en la región de bisagra (McLellan *et al., Nature* 480, 336, (2011)) con el fin de atrapar F en el estado de prefusión. Alternativamente, las células que expresan Fd F(+) de RSV se cotransfectaron con casetes de expresión de ADN separados que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo (FIG. 5). La expresión óptima de un complejo de glicoproteína D25-F se obtuvo de la cotransfección del ADN que codifica Fab de D25 con ADN que codifica Fd F(+) de RSV; rendimientos de complejo razonables también se observaron de la adición de Fab soluble.

Las cristalizaciones se detectaron para Fab de D25 y AM22, solos o en complejo con Fd F(+) de RSV. Los datos de difracción de rayos X a la resolución de 1.6 Å se obtuvieron en cristales hexagonales de Fab de D25 por sí mismo, y la estructura se resolvió por el reemplazo molecular y se refinó a R_{cryst}/R_{libre} de 24.5/25.7 % (Tabla 9). Los datos a la resolución de 3.6 Å se obtuvieron en cristales cúbicos de Fab de D25 en complejo con Fd F(+) de RSV, y esta estructura se resolvió por el reemplazo molecular utilizyo la estructura de D25 no unida y porciones de la estructura de F de RSV de postfusión previamente determinada (*McLellan et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011); Swanson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 108, 9619 (2011)) como modelos de búsqueda, junto con indicios de un derivado de oro. La estructura del complejo se refinó a R_{cryst}/R_{libre} de 21,3/26.7 % (FIG. 1C) (Tabla 9).

Un complejo de Fab de D25 unido a una molécula de la glicoproteína F de RSV estuvo presente en la unidad asimétrica de la red cúbica. La simetría de red triple posicionó dos de otros complejos F de D25-RSV para generar una interfaz trimérica F de RSV extensiva de 2.098 $Å^2$. La densidad electrónica continua se observó para los residuos 26 a 513, excepto para los residuos 98-136 que incluyeron el fragmento de 27 aminoácidos eliminado por la escisión proteolítica del precursor F_0 para formar las subunidades F_2 y F_1 (correspondientes a fragmentos N- y C-terminales, respectivamente) de la glicoproteína F madura. Tres sitios de glicosilación N-enlazada se detectaron en la densidad de electrones en los residuos de asparagina 27, 70 y 500 (FIG. 2A).

Globalmente, la estructura F de RSV unida a D25 consiste en dos lóbulos empaquetados en cualquier extremo de una ampolla de extremo abierto antiparalelo de 7 cadenas, dos cadenas de las cuales (β2 y β7) se extienden entre los dos lóbulos, la unión de hidrógeno para más de 70 Å y formyo porciones integrales de ambos lóbulos y la ampolla central. El lóbulo proximal a la membrana, que contiene el extremo N de F_2 y el extremo C de F_1, consiste en un sándwich β de triple capa y tres hélices (α8, α9 y α10). La hélice α10 forma parte de una hélice que aparece para extenderse en la membrana viral y a la cual se adjuntó el dominio de trimerización de fibrina. El lóbulo distal a la membrana, aproximadamente 90 Å de la membrana viral, consiste en siete hélices, empaquetadas alrededor de una lámina antiparalela de tres cadenas y una horquilla β (β3+β4). Los contactos inter-protómero extensivos parecen estabilizar la estructura trimérica, particularmente el N-terminal hidrófobo de la subunidad F_1 (también conocido como el péptido de fusión), que se interrumpió por el sándwich β triple del lóbulo proximal a la membrana de un protómero vecino. El péptido de fusión, contenido dentro de la cavidad de otro modo hueca del trímero, se conecta a las hélices α2 y α3 expuestas en la superficie a través de una abertura cilíndrica entre los protómeros que es de aproximadamente 10 Å de diámetro; esta abertura se puede utilizar como una ruta de salida para el péptido de fusión durante la activación.

La estructura de la glicoproteína F unida a D25 se asemeja a la armazón de prefusión de la glicoproteína F del virus de parainfluenza 5 (PIV5) relacionada (Welch *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 109, 16672 (2012); Yin *et al., Nature,* 439, 38 (2006)) (FIGs. 6 y 7). La forma de F de RSV unida a D25 parece, por lo tanto, estar en la conformación de prefusión (FIG. 2). Para definir los reordenamientos estructurales entre la forma de F de RSV unida a D25 de pre- y post-fusión se comparó con su conformación de postfusión, que se determinó recientemente (McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011); Swanson *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 108, 9619 (2011).

Las conformaciones de pre- y post-fusión de F de RSV revelaron cambios drásticos en la forma global, desde una estructura en forma de óvalo relativamente compacta con una altura de 110 Å a un cono extendido aproximadamente 50 % más largo (170 Å) (FIG. 2A). A pesar de este cambio notable en la conformación, la mayoría de la estructura secundaria y terciaria de la glicoproteína F se preservó en ambos estados de pre- y post-fusión, mostryo 215 residuos menos de 2 Å de desviación de Cα entre las dos estructuras (FIGs. 2A,B). Se producen dos regiones de cambio conformacional acentuante. En el lóbulo distal de la membrana, el péptido de fusión y los cinco elementos de estructura secundarios (α2, α3, β3, β4 y α4) se unen con la hélice α5 para formar una hélice de postfusión extendida individual ($\alpha5_{post}$) de más de 100 Å de longitud, que está rematada en su extremo N por el péptido de fusión (para ayudar en la claridad, los elementos de estructura secundarios de la

estructura de postfusión se marcan con el subíndice "post"). En el lóbulo proximal a la membrana, la cadena paralela sola (β22) del sándwich β triple—que en la estructura de prefusión el hidrógeno se une a β1—se desenmaraña, permitiéndose a la hélice α10 de prefusión unirse con la hélice $\alpha5_{post}$. Conjuntamente, las hélices $\alpha5_{post}$ y $\alpha10_{post}$ yuxtaponen los extremos N y C de F_1 para formar la estructura de espiral enrollada característica de las proteínas de fusión tipo I en su conformación de postfusión (Colman y Lawrence, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 309 (2003)). Globalmente, las porciones de la hélice α10 se mueven más de 170 Å entre las conformaciones de pre- y post-fusión.

En comparación con las estructuras de hemaglutinina de influenza tipo I de prefusión, escindida de proteasa previamente reseñadas (Wilson *et al., Nature,* 289, 366 (1981)), Ebola GP (Lee *et al., Nature,* 454, 177 (2008)) y PIV5 F (Welch *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 109, 16672 (2012)), la ubicación del péptido de fusión de RSV es más similar al de la hemaglutinina (FIG. 7), que sorprendente se indica que PIV5 y RSV ambos son paramixovirus. El péptido de fusión F de RSV se entierra en el centro de la cavidad de trímero hueca, y se ubica más de 40 Å lejos del último residuo F_2 visible. Esto sugiere que un reordenamiento estructural sustancial del péptido de fusión se produce después de que el precursor F_0 se escinda por la proteasa huésped similar a furina para producir F_1/ F_2. Además, se producen reordenamientos estructurales drásticos entre las conformaciones de pre- y post-fusión tanto en los lóbulos proximales a la membrana como los lóbulos distales de la membrana, que proporcionan discernimiento en la dificultad de estabilizar la conformación de prefusión de F de RSV. A diferencia de F de PIV5 y F de metapneumovirus humano, que se puede estabilizar en el estado de prefusión solamente al adjuntar un motivo de trimerización GCN4 al extremo C (Yin *et al., Nature,* 439, 38 (2006); Wen *et al., Nat. Struct. Mol. Biol.,* 19, 461 (2012)), la conformación F de RSV de prefusión requiere la estabilización tanto del lóbulo proximal a la membrana (logrado al adjuntar un dominio de trimerización de fibritina (Frank *et al., J. Mol. Biol.,* 308, 1081 (2001)) como el lóbulo distal de la membrana (que se produce a través de la unión del anticuerpo D25).

El anticuerpo D25 reconoce el ápice distal de la membrana de la glicoproteína F de RSV (FIG. 1C). Éste se une a un epítopo cuaternario, interactuyo la cadena pesada de D25 con un protómero (que implica 638 $Å^2$ de área de superficie interactiva enterrada en RSV) y la unión de la cadena ligera de D25 tanto al mismo protómero (373 $Å^2$) como a un protómero vecino (112 $Å^2$) (FIG.3A). Los contactos de F de RSV se hacen por 5 de los 6 bucles de determinación de la complementariedad de D25, interactuyo la 3ª CDR de cadena pesada (CDR H3) con la hélice α4 (residuos 196-210 de F_1) y formyo enlaces hidrógeno intermoleculares con los residuos 63, 65, 66 y 68 de F_2 en el bucle entre la cadena β2 y la hélice α1. Si bien los elementos estructurales secundarios del epítopo D25 permanecen principalmente sin cambio, su orientación relativa cambia sustancialmente, pivotyo la hélice α4 ~180° con relación a la cadena β2 en la conformación de pre- y post-fusión (FIG. 3B). Este reordenamiento estructural explica el fracaso de D25 de unirse a moléculas F de postfusión y sugiere que D25 inhibe la fusión de membrana al estabilizar la conformación de prefusión del complejo de glicoproteína F trimérico. Aunque las proteínas F de los subtipos A y B de RSV humano están altamente relacionadas en la secuencia (447/472 o 94.7 % de los aminoácidos que comprenden el ectodominio F_2/F_1 maduro son idénticos entre los subtipos conocidos), seis posiciones naturalmente observadas de variación de secuencias de RSV (residuos 67 y 74 en F_2, y residuos 200, 201, 209 y 213 en F_1) se ubican en la región unida por D25 (FIG. 3C). De manera similar, de los 56 aminoácidos en F de RSV bovino que no son idénticos al ectodominio maduro del subtipo A de F de RSV humano, 13 se encuentran en esta misma región (FIG. 3C). Por lo tanto, el epítopo D25, en el ápice de la estructura F de RSV de prefusión, puede estar bajo presión inmune y puede servir como un determinante de la inmunidad específica del subtipo (Chambers *et al., J. Gen. Virol.,* 73, 1717 (1992)). Por ejemplo, en base al análisis de la secuencia, se planteó como hipótesis que una región de bucle en las glicoproteínas F existe dentro de la familia Paramyxoviridae que podría estar bajo presión inmune (Chambers *et al., J. Gen. Virol.,* 73, 1717 (1992)). Se ha demostrado que la unión de los anticuerpos monoclonales específicos del subgrupo de RSV se pueden ver afectados por mutaciones dirigidas al sitio entre los residuos 200 y 216 de F_1 (Connor *et al., J. Med. Virol.,* 63, 168 (2001)), y que un péptido que comprende los residuos 205-225 de F1 podría inducir la actividad neutralizante en conejos, aunque no se definió un epítopo específico (Corvaisier *et al., Arch. Virol.,* 142, 1073 (1997)).

Para entender la relación del epítopo D25 con relación a la epítopos reconocidos por otros anticuerpos neutralizantes de RSV, se testó la competición para la unión de D25 a células infectadas de RSV (FIG. 4A). Notablemente, AM22 compitió con D25 por la unión de F de RSV, sugiriendo que reconocieron el mismo sitio antigénico. Para definir adicionalmente el sitio reconocido por estos anticuerpos, se realizó una EM de tinción negativa en los complejos de Fab-F de RSV. Las imágenes EM de los complejos de Fab D25-F de RSV se asemejaron a la estructura cristalina de Fab D25-F de RSV y también las imágenes de EM de Fab AM22-F de RSV (FIG. 4B). Conjuntamente, estos resultados sugirieron que los anticuerpos D25 y AM22 reconocen el mismo o un sitio antigénico altamente relacionado, que se denominó "sitio antigénico Ø".

Para caracterizar los anticuerpos que reconocen el sitio antigénico Ø, se examinaron sus propiedades funcionales. Además de su potencia extraordinaria y especificidad de prefusión (FIG. 1A), los tres anticuerpos inhibieron fuertemente la fusión cuyo se añadieron post-fijación (FIG. 4C), y los tres fueron incapaces de bloquear la fijación a la superficie de la célula (FIG. 4D), sugiriendo que el receptor de F de RSV se une a una

región en F no bloqueada por estos tres anticuerpos. El dominio de unión del receptor en la proteína F de metapneumovirus humano relacionado es un motivo RGD (Cseke *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 106, 1566 (2009)) que corresponde a los residuos 361-363 de F de RSV, que residen en la punta de un bucle de la ampolla central, en el lado del trímero F de RSV de prefusión no bloqueado por la unión de D25. Aunque estos anticuerpos no evitan la unión, se conoce que las regiones tanto de F_2 como de F_1 que comprenden el sitio antigénico Ø contribuyen a la unión de heparina (Feldman *et al., J. Virol.,* 74, 6442 (2000); Crim *et al., J. Virol.,* 81, 261 (2007)), y es posible que esta región puede contribuir a la fijación no específica a restos de sulfato de heparina en glicosaminoglicanos de acuerdo con la glicoproteína G y otras regiones de F. Por último, los anticuerpos AM22 y D25 neutralizaron de manera similar tanto los contextos de Fab como de inmunoglobulina (FIG. 8), indicyo que la avidez no juega un papel dominante como lo hace para algunos anticuerpos del virus de la influenza (Ekiert *et al., Nature,* 489, 526 (2012)). Globalmente, la especificidad de unión compartida y los fenotipos de neutralización de D25 y AM22 sugieren que estas propiedades pueden ser características de anticuerpos que reconocen el sitio antigénico Ø. Por el contrario, ninguno de los anticuerpos que reconocen otros sitios antigénicos en F de RSV asociados con la actividad neutralizante (sitios I, II y IV) comparten propiedades similares de potencia neutralizante y especificidad F de prefusión F (FIG. 9A-9B).

A pesar de que el sitio antigénico Ø está parcialmente protegido del reconocimiento inmune por múltiples mecanismos que incluyen el enmascaramiento conformacional (está únicamente presente en el estado de prefusión metaestable), el ensamblaje cuaternario (el sitio es compartido por protómeros RSV), la variación antigénica (ésta es una de las porciones más variables de F de RSV) y la protección del glicano (el glicano *N*-enlazado fijado a Asn70 está en la parte superior del trímero F de prefusión), los tres anticuerpos específicos de prefusión parecen fijar como objetivo un epítopo similar. La ubicación del sitio antigénico Ø en el ápice del trímero F de prefusión debe ser fácilmente accesible, incluso en la superficie de virión coronada, que puede explicar la observación de que la actividad más neutralizante en sueros humanos inducidos por la infección por RSV natural se dirige contra la forma de prefusión de F de RSV (Magro *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 109, 3089 (2012)), aunque no se pueden descartar otros sitios antigénicos específicos de prefusión. La alta potencia de anticuerpos contra el sitio antigénico Ø sugiere que podrían ser desarrollados para la profilaxis pasiva de la enfermedad inducida por RSV en neonatos. También, la inducción del anticuerpo específico de prefusión basado en vacuna se puede ayudar por la estabilización de la forma de prefusión de F de RSV, quizás facilitado por el enlace de las porciones móviles e inmóviles de la estructura de F a través del diseño basado en la estructura de las variantes F de RSV con enlaces disulfuro. Se observa que F estabilizada en prefusión contiene todos los epítopos neutralizantes previamente caracterizados, así como el sitio antigénico Ø. La definición de la estructura D25-F de RSV proporciona, por lo tanto, la base para múltiples nuevos enfoques para prevenir la enfermedad inducida por RSV.

Materiales y Métodos

Virus y células. Extractos virales se prepararon y se mantuvieron como se describe previamente (Graham *et al., J. Med. Virol.,* 26, 153 (1988)). La Proteína Fluorescente Verde (GFP, por sus siglas en inglés) que expresa RSV, RSV-GFP, se construyó como se informó previamente (Hallak *et al.,* Virology. 271, 264 (2000)). El título de los extractos de RSV-GFP utilizado para los ensayos de neutralización y fusión basados en la citometría de flujo fue $2.5x10^7$ ufp/ml. El título del extracto A2 de RSV utilizado para el ensayo de fijación fue 1.02×10^8 ufp/ml. Las células HEp-2 se mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle que contenía suero bovino fetal al 10 % (EMEM al 10 %) y se complementaron con glutamina, penicilina y estreptomicina.

Creación de plásmidos de expresión de anticuerpos. Regiones variables pesada y ligera del anticuerpo que codifica ADN se optimizaron en codones para la expresión humana y se sintetizaron. Las regiones variables pesada y ligera de AM22 y D25 se subclonaron en los plásmidos de expresión pVRC8400 que contenían dominios constantes humanos en marco (IgG1 para la cadena pesada y kappa para la cadena ligera). Las variantes de los plásmidos de expresión de la cadena pesada de AM22 y D25 se hicieron al insertar ya sea un sitio de proteasa HRV3C (GLEVLFQGP; SEQ ID NO: 355) o un codón de parada en la región de bisagra.

Expresión y purificación de anticuerpos y fragmentos Fab. Los anticuerpos se expresaron mediante la co-transfección transitoria de plásmidos de cadena pesada y ligera en células HEK293F en suspensión a 37 °C durante 4-5 días. Los sobrenadantes celulares se hicieron pasar sobre agarosa de Proteína A, y los anticuerpos unidos se lavaron con PBS y se eluyeron con tampón de elución de IgG en 1/10º de volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Los Fabs de AM22 y D25 se crearon al digerir la IgG con Lys-C. La digestión se inhibió por la adición de tabletas de cóctel de inhibidor de proteasa completa, y las mezclas de Fab y Fc se hicieron pasar nuevamente sobre agarosa de Proteína A para eliminar los fragmentos Fc. El Fab que fluyó a través de la columna se purificó, además, mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Ensayos de neutralización de RSV. La neutralización mediada por anticuerpos se midió mediante un ensayo de neutralización de citometría de flujo (Chen *et al., J. Immunol. Methods,* 362, 180 (2010). Brevemente, células HEp-2 se infectaron con RSV-GFP y la infección se monitorizó como una función de la expresión de GFP en 18 horas de post-infección mediante citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante el ajuste de la curva y la regresión no lineal (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego CA).

Ensayo de unión de F de RSV de postfusión. La proteína F de RSV soluble, purificada en la conformación de postfusión se preparó como se describe en (McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011). Un ELISA cinético se utilizó para testar la unión de los anticuerpos monoclonales a la F de RSV de postfusión como se describe previamente (McLellan *et al., J. Mol. Biol.,* 409, 853 (2011)). Brevemente, placas recubiertas de Ni^{2+}-NTa de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific) se recubrieron con 100 µl de F de RSV de postfusión (1 µg/ml) durante una hora a temperatura ambiente. 100 µl de anticuerpo diluido se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se detectaron al incubar las placas con 100 µl de anticuerpos IgG anti-ratón de cabra conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) o IgG anti-humana conjugada con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 100 µl del sustrato de ELISA Super AquaBlue (eBioscience, San Diego CA) a cada uno de los pocillos y las placas se leyeron inmediatamente utilizyo un lector de microplaca Dynex Technologies a 405 nm (Chantilly, VA). Entre las etapas, las placas se lavaron con PBS-T.

Cristalización y recogida de datos de rayos X del Fab D25 no unido. Las condiciones de cristalización se detectaron utilizyo un robot de cristalización Cartesian Honeybee, y los cristales iniciales se cultivaron mediante el método de difusión de vapor en gotitas asentadas a 20 °C al mezclar 0.2 µl de Fab D25 con 0.2 µl de la solución de depósito (PEG 4000 al 22 % (p/v), acetato de sodio 0.1 M pH 4.6). Los cristales se reprodujeron manualmente en gotitas colgantes al combinar la proteína y la solución de depósito en una relación 2:1. Los cristales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido en PEG 4000 al 27.5 % (p/v), acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 y 2R,3R-butanodiol al 15 % (v/v). Los datos de difracción de rayos X a 1.6 Å se recogieron en una longitud de onda de 1.00 Å en la línea de luz ID-22 de SER-CAT (Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory).

Determinación de la estructura y refinamiento de Fab D25 no unido. Los datos de difracción de rayos X se integraron y se escalaron con el sitio HKL2000 (Otwinowski y Minor, en Methods Enzymol. (Academic Press, vol. 276, pp. 307-326, 1997)), y una solución de reemplazo molecular utilizyo los dominios Ig de PDB ID: 3GBM (Ekiert *et al., Science,* 324, 246 (2009)) y 3IDX (Chen *et al., Science,* 326, 1123 (2009)) como modelos de búsqueda se obtuvo utilizyo PHASER (McCoy *et al., J. Appl. Crystallogr.,* 40, 658 (2007)). La construcción del modelo manual se llevó a cabo utilizyo COOT (Emsley *et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* 66, 486 (2010)) y el refinamiento de sitios individuales, parámetros de TLS y factores B individuales se realizó en PHENIX (Adams *et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* 66, 213 (2010)). La densidad de electrones para los dominios variables D25 fue excelente, pero la densidad de electrones para los dominios constantes fue pobre, posiblemente un resultado de la flexibilidad en el ángulo de codo. La colección de datos final y la estadística de refinamiento se presentan en la Tabla 8.

Expresión y purificación de Fd F(+) de RSV en complejo con Fab D25. La construcción de proteína Fd F(+) de RSV se derivó de la cepa A2 (acceso P03420) con tres sustituciones que se producen de forma natural (P102A, 1379V y M447V) para aumentar la expresión. Un gen optimizado en codones de mamífero que codifica los residuos 1-513 de F de RSV con un motivo de trimerización de fibritina T4 C-terminal (Frank *et al., J. Mol. Biol.,* 308, 1081 (2001)), el sitio de trombina, la etiqueta 6x His y StreptagII se sintetizó y se subclonó en un vector de expresión de mamífero derivado de pLEXm (Aricescu *et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* 62, 1243 (2006)). Los plásmidos que expresan Fd F(+) de RSV, la cadena ligera de D25 y la cadena pesada de D25 (con o sin un codón de parada en la región de bisagra) se transfectaron simultáneamente en células HEK293 $GnTI^{-/-}$ (Reeves *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 99, 13419 (2002)) en suspensión. Alternativamente, solo el plásmido Fd F(+) de RSV podría ser transfectado, con Fab D25 purificado añadido a las células $GnTI^{-/-}$ 3 horas post- transfección. Después de 4-5 días, el sobrenadante celular se recogió, se centrifugó, se filtró y se concentró. El complejo se purificó inicialmente por la vía de la resina Ni^{2+}-NTA (Qiagen, Valencia, CA) utilizyo un tampón de elución que consiste en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 200 mM e imidazol 250 mM pH 8.0. El complejo se concentró luego y, además, se purificó sobre la resina StrepTactin según las instrucciones del fabricante (Novagen, Darmstadt, Alemania). Después de una incubación durante la noche con la proteasa de trombina (Novagen) para eliminar las etiquetas His y Strep, se añadió un exceso de Fab D25 al complejo, que luego se purificó en una columna de filtración de gel Superose6 (GE Healthcare) con un tampón de desarrollo de Tris-HCl 2 mM pH 7.5, NaCl 350 mM y NaN_3 al 0.02 %. El complejo eluido se diluyó con un volumen igual de agua y se concentró a ~ 5 mg/ml. Procedimientos similares se utilizaron para expresar y purificar complejos de Fab AM22.

Cristalización y recopilación de datos de rayos X de Fd F(+) de RSV en complejo con Fab D25. Cristales iniciales se cultivaron por el método de difusión de vapor en gotas asentadas a 20 °C al mezclar 0.1 µl de Fd F(+) de RSV unido a Fab D25 con 0.1 µl de solución de depósito (PEG 400 al 40 % (p/v), PEG 3350 al 5 % (p/v) y acetato de sodio 0.1 M pH 5.5) (Majeed *et al., Structure,* 11, 1061 (2003)). Los cristales se reprodujeron manualmente en gotas colgantes, y el cristal que difractó a 3.6 Å se cultivó utilizyo una solución de depósito que contenía PEG 400 al 30 % (p/v), PEG 3350 al 3.75 % (p/v), HEPES 0.1 M pH 7.5 y 1.2-butanodiol al 1 % (v/v). El cristal se transfirió directamente desde la gota a la criocorriente y los datos de difracción de rayos X se recolectaron remotamente en una longitud de onda de 1.00 Å en la línea de luz ID-22 de SER-CAT.

Determinación de la estructura y refinamiento de Fd F(+) de RSV en complejo con Fab D25. Los datos de difracción de rayos X se integraron y se escalaron con el sitio HKL2000 (Otwinowski y Minor, en Methods Enzymol. (Academic Press, vol. 276, pp. 307-326, 1997)), y una solución de reemplazo molecular se obtuvo por PHASER (McCoy *et al., J. Appl. Crystallogr.,* 40, 658 (2007)) usyo la estructura Fab D25 no enlazada y los residuos 29-42, 49-60, 78-98, 219-306, 313-322, 333-343 y 376-459 de la estructura de F de RSV de postfusión (PDB ID: 3RRR, McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788 (2011)) como modelos de búsqueda. Seis sitios de un derivado de $NaAuCl_4$ mapeado a cadenas laterales reactivas conocidas (residuos F Met97/Hisl59, Met264/Met274, His317 y Met396; residuos de cadena pesada de D25 Met19/His82 y His59). La construcción del modelo manual se llevó a cabo utilizyo COOT (Emsley *et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* 66, 486 (2010)), con elementos de estructura secundaria que se construyen primero. El refinamiento de los sitios individuales, parámetros de TLS y factores B individuales se realizó en PHENIX (Adams *et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* 66, 213 (2010)), utilizyo la estructura Fab D25 no unida, y porciones de la estructura F de RSV de postfusión como modelos de referencia durante el refinamiento. Todos los residuos de F de RSV en la proteína madura se construyeron excepto para aquellos residuos en C-terminal de F_2 a Met97. La recolección de datos final y la estadística de refinamiento se presentan en la Tabla 9.

Ensayo de unión de competición de F de RSV. La unión de competición de anticuerpos se realizó en células HEp-2 infectadas con RSV. Las células HEp-2 se infectaron con 3 MOI (siglas inglesas de multiplicidad de infección) de RSV durante 18-20 horas. Después de la infección, las células se separaron utilizyo la solución de disociación de células (Cellstripper, Mediatech Inc., Herndon, VA) y se lavaron con PBS. Las células se sembraron a razón de 5×10^4/pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos en PBS. Anticuerpos monoclonales AM22, D25 y 101F se diluyeron comenzyo en una concentración de 100 µg/ml, y se añadieron a las células HEp-2. Después de 30 minutos 100 µl de D25 conjugado con Alexa 488 se añadió a una concentración de 1 µg/ml y se incubó a 4 °C durante una hora. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se fijaron con paraformaldehído al 0.5 %. El unión de D25-Alexa 488 en las células se midió mediante citometría de flujo (instrumento LSR II, Becton Dickinson, San Jose, CA). Los datos se analizaron al utilizar el software FlowJo, versión 8.5 (Tree Star, San Carlos, CA).

Análisis de microscopía electrónica de tinción negativa. Las muestras se adsorbieron a rejillas recubiertas de carbono descargado de brillo recientemente, se enjuagaron poco tiempo con agua y se tiñeron con formato de uranilo al 0.75 % recientemente hecho. Las imágenes se registraron en un microscopio FEI T20 con una cámara Eagle CCD. El análisis de la imagen y el promedio 2D se realizó con Bsoft (Heymann y Belnap, *J. Struct. Biol.,* 157, 3 (2007) y EMAN (Ludtke *et al., J. Struct. Biol.,* 128, 82 (1999)).

Ensayo de inhibición de la fusión del virus RSV a la célula. La capacidad de los anticuerpos de inhibir la fusión del virus RSV a la célula se midió como se describe previamente (McLellan *et al., J. Virol.,* 84, 12236 (2010)). Brevemente, células HEp-2 se sembraron en placas de 96 pocillos, se cultivaron durante 24 horas a 37 °C, y luego se enfriaron a 4 °C durante una hora antes del ensayo. RSV-GFP se añadió a las células pre-enfriadas a 4 °C, y luego las células se lavaron en PBS frío para eliminar el virus no unido. Los anticuerpos diluidos en serie se añadieron a células enfriadas rápidamente y se incubaron durante 1 hora a 4 °C, antes de la transferencia a 37 °C durante 18 horas. Después de la incubación, las células se tripsinizaron, se fijaron en paraformaldehído al 0.5 % y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la frecuencia de células que expresan GFP.

Ensayo de inhibición de fijación de RSV. La capacidad de los anticuerpos de inhibir la fijación de RSV a las células se midió como se describe previamente (McLellan *et al., J. Virol.,* 84, 12236 (2010)). Brevemente, las células HEp-2 se dispersaron en el medio, se lavaron con PBS frío, se sembraron en placas de fondo en V de 96 pocillos y se enfriaron rápidamente durante 1 hora a 4 °C antes del uso. Anticuerpos y heparina, un inhibidor de la fijación de RSV conocido, se distribuyeron en diluciones en serie y luego se mezclaron con el virus de la cepa A2 de RSV durante una hora a 37 °C. El medio de las células enfriadas rápidamente se eliminó después de la centrifugación y el virus o mezclas de virus y reactivos se añadieron a las células enfriadas rápidamente y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS frío para eliminar el virus no unido, y se fijaron con paraformaldehído al 0.5 %. Los virus unidos en las células se detectaron con el anticuerpo anti-RSV de cabra conjugado con FITC. Las células se lavaron en PBS frío y se evaluaron mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia medianas del virus unido se analizaron con el software FlowJo, versión 8.5 (Tree Star, San Carlos, CA).

Tabla 9. Recopilación de datos cristalográficos y estadística de refinamiento.

	Fab D25	Fab D25 + F de RSV
Recopilación de datos		
Grupo espacial	$P6_122$	$P2_13$
Constantes de células		

a, b, c (Å)	108.7, 108.7, 139.9	152,3, 152,3, 152,390.0,
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0
Longitud de onda (Å)	1.00	1.00
Resolución (Å)	50.0-1.6 (1.63-1.60)	50.0-3.6 (3.73-3.60)
$R_{combinación}$	11.2 (68.0)	12.7 (81.4)
$I/\sigma I$	27,3 (2.1)	16.4 (2.0)
Completitud (%)	98,3 (86.1)	99.6 (99,3)
Redundancia	11.0 (5,3)	6.5 (5.2)
Refinamiento		
Resolución (Å)	35.4-1.6 (1.62-1.60)	42.2-3.6 (3.88-3.60)
Reflexiones Únicas	63.360 (2.241)	13.877 (2.742)
$R_{trabajo}$ / R_{libre} (%)	24.1/25.5	21,3/26.7
Nº átomos		
Proteína	3.305	6.778
Ligyo/ion	0	0
Agua	270	0
Factores *B* (Å^2)		
Proteína	53.0	128.1
Ligyo/ion	-	-
Agua	44.1	-
Desviaciones R.m.s.		
Longitudes de unión (Å)	0.007	0.003
Ángulos de unión (°)	1.20	0.91
Ramachyran		
Favorecido (%)	96.5	92.0
Permitido (%)	3.0	7,3
Atípico (%)	0.5	0.7

Ejemplo 2

Estabilización de Proteínas F de RSV

Este ejemplo ilustra el diseño de proteínas F de RSV ejemplares estabilizadas en una conformación de prefusión. La estructura cristalina de la proteína F de RSV en complejo con Fab D25 (*es decir,* en una conformación de prefusión) comparada con la estructura de la proteína F de RSV de postfusión (descritas, *p. ej.,* en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011 con las coordenadas depositadas como Acceso de PDB Nº 3RRR) muestra reordenamientos estructurales notables entre las conformaciones de pre- y post-fusión en los lóbulos tanto proximales a la membrana como distales de la membrana, que proporciona guía para la estabilización de la conformación de prefusión de F de RSV. En base a una comparación de las estructuras F de RSV de pre- y post-fusión, existen dos regiones que se someten a cambios conformacionales gryes, ubicados en los extremos N y C de la subunidad F_1. Por ejemplo, cómo se ilustra en la FIG. 2, las posiciones 137-216 y 461-513 del polipéptido F_1 se someten a reordenamiento estructural entre las conformaciones de proteína F de Pre- y Post-, mientras que las posiciones 271-460 del polipéptido F_1 permanecen relativamente sin cambio. Este ejemplo ilustra varias estrategias para estabilizar la proteína F de RSV en su conformación de prefusión.

Para estabilizar la región N-terminal de F_1, que es un componente del sitio antigénico Ø y está implicado en la unión al anticuerpo D25, se han diseñado diversas estrategias, que incluyen la introducción de enlaces disulfuro

intra-protómero, enlaces disulfuro inter-protómero, sustituciones de aminoácido de relleno de cavidad, sustituciones de reempaquetamiento, introducción de sitios de glicosilación N-enlazados y combinaciones de los mismos.

Enlaces disulfuro intra-protómero

La introducción de dos residuos cisteína que están dentro de una distancia suficientemente cercana para formar un enlace disulfuro intra-protómero en la conformación de prefusión, pero no en postfusión, puede bloquear la proteína F en la conformación de prefusión. Un enlace disulfuro intra-molecular se puede formar dentro de un solo protómero F_2/F_1 dentro del trímero y, por lo tanto, no reticularía los tres protómeros conjuntamente. Específicamente, un enlace disulfuro formado entre una región que cambia la conformación y una región que no cambia la conformación en las estructuras de pre- y post-fusión debería bloquear la proteína en la conformación de prefusión. Un ejemplo es el del mutante S155C/S290C, en que Ser155 está ubicado en una región que cambia la conformación, mientras que Ser290 está en una región que no cambia la conformación. Adicionalmente, la formación de un enlace disulfuro entre dos regiones que ambas cambian la conformación, tal como dos residuos ubicados dentro de las posiciones 137-216 de F_1, o dos residuos ubicados dentro las posiciones 461-513 de F_1, o un residuo dentro de las posiciones 137-216 de F_1 y el segundo dentro de las posiciones 461-513 de F_1, también pueden ser suficientes para bloquear la proteína en la conformación de prefusión.

Utilizyo los métodos descritos anteriormente, se determinó que varios pares de residuos de la proteína F de RSV están en proximidad suficientemente estrecha en la conformación de prefusión, pero no en la conformación de postfusión, para formar un enlace disulfuro intra-protómero si las cisteínas se introducen en las posiciones del par de residuo correspondiente. Estos pares de residuos, así como las sustituciones de aminoácido correspondientes a SEQ ID NO: 1, necesarias para introducir los residuos cisteína en estas posiciones, se indican en la Tabla 10. La Tabla 10 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y correspondiente a un construcción de F_0 precursor que incluye un péptido señal, polipéptido F2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y etiqueta Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 10. Pares de Cisteína Reticulados Ejemplares para la Estabilización del Enlace Disulfuro Intra-Protómero

Par(es) de Residuo de proteína F para la Sustitución de Cisteína	Sustituciones de A.A. correspondientes a SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
Sustituciones F_1		
155 y 290	S155C y S290C	185
151 y 288	G151C y I288C	189
137 y 337	F137C y T337C	213
397 y 487	T397C y E487C	247
138 y 353	L138C y P353C	257
341 y 352	W341C y F352C	267
403 y 420	S403C y T420C	268
319 y 413	S319C y I413C	269
401 y 417	D401C y Y417C	270
381 y 388	L381C y N388C	271
320 y 415	P320C y S415C	272
319 y 415	S319C y S415C	273
331 y 401	N331C y D401C	274
320 y 335	P320C y T335C	275
406 y 413	V406C y I413C	277
381 y 391	L381C y Y391C	278
357 y 371	T357C y N371C	279
403 y 417	S403C y Y417C	280
321 y 334	L321C y L334C	281
338 y 394	D338C y K394C	282
288 y 300	I288C y V300C	284
Sustituciones F_2 y F_1		
60 y 194	E60C y D194C	190
33 y 469	Y33C y V469C	211
54 y 154	T54C y V154C	212
59 y 192	I59C y V192C	246

46 y 311	S46C y T311C	276
48 y 308	L48C y V308C	283
30 y 410	E30C y L410C	285

Enlaces disulfuro intermoleculares

La introducción de dos residuos cisteína que están dentro de una distancia suficientemente cercana para formar un enlace disulfuro inter-protómero en la conformación de prefusión, pero no en la postfusión, puede bloquear la proteína F en la conformación de prefusión. Se formaría un enlace disulfuro inter-protómero entre protómeros adyacentes dentro del trímero, y, por lo tanto, reticularía los tres protómeros conjuntamente. Específicamente, un enlace disulfuro formado entre una región que cambia la conformación y una región que no cambia la conformación en las estructuras de pre-y post-fusión debería bloquear la proteína en la conformación de prefusión. Un ejemplo es el del mutante A153C/K461C en donde Ala153 está ubicado en una región que cambia la conformación, mientras que Lys461 está en una región que no cambia la conformación. Adicionalmente, la formación de un enlace disulfuro entre dos regiones que ambas cambian la conformación, tales como dos residuos ubicados dentro de las posiciones 137-216 de F_1, o dos residuos ubicados dentro de las posiciones 461-513 de F_1, o un residuo dentro de las posiciones 137-216 de F_1 y el segundo dentro de las posiciones 461-513 de F_1, también puede ser suficiente para bloquear la proteína en la conformación de prefusión.

Utilizyo los métodos descritos anteriormente, se determinó que varios pares de residuos de la proteína F de RSV están en bastante estrecha proximidad en la conformación de prefusión, pero no en la conformación de post-fusión, para formar un enlace disulfuro inter-protómero si las cisteínas se introdujeron en las porciones del par de residuos correspondiente. Estos pares de residuos, así como las sustituciones de aminoácido correspondientes necesarias para introducir residuos cisteína en estas posiciones, se indican en la Tabla 11. La Tabla 11 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y correspondiente a un construcción de F_0 precursor que también incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 11. Pares de Cisteínas Reticuladas Ejemplares para la Estabilización del Enlace Disulfuro Inter-Protómero

Par(es) de residuos de proteína F	Sustituciones de A.A. correspondientes a SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
Sustituciones F_1		
400 y 489	T400C y D489C	201
144 y 406	V144C y V406C	202
153 y 461	A153C y K461C	205
149 y 458	A149C y Y458C	207
143 y 404	G143C y S404S	209
346 y 454	S346C y N454C	244
399 y 494	K399C y Q494C	245
146 y 407	S146C y I407C	264
374 y 454	T374C y N454C	265
369 y 455	T369C y T455C	266
402 y 141	V402C y L141C	302
Sustituciones F_2 y F_1		
74 y 218	A74C y E218C	243

Adicionalmente, se pueden combinar múltiples mutaciones estabilizantes descritas en la presente para generar un antígeno PreF que contiene más de una mutación estabilizante. Ejemplos de construcciones de este tipo que contienen un primer y un segundo par de residuos que forman un enlace disulfuro intra- o inter-protómero se proporcionan en la Tabla 12. La Tabla 12 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y correspondiente a una construcción de F_0 precursor que también incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 12. Pares de Cisteína Reticulados Ejemplares para Combinaciones de la Estabilización de Enlace Disulfuro Intra- e Inter-Protómero

Par(es) de residuos de proteína F	Sustituciones correspondientes a SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO

155 y 290 (Intra); y 402 y 141 (Inter)	S155C y S290C; y V402C y L141C	303
155 y 290(Intra); y 74 y 218	S155C y S290C; y A74C y E218C	263

Además, los aminoácidos se pueden insertar (o suprimir) de la secuencia de proteína F para ajustar el alineamiento de los residuos en la estructura de proteína F, de modo que pares de residuos particulares están dentro de una distancia suficientemente cercana para formar un enlace disulfuro intra- o inter-protómero en la conformación de prefusión, pero no en postfusión, que, como se discutió anteriormente, estabilizará la proteína F en la conformación de prefusión. Ejemplos de modificaciones de este tipo se proporcionan en la Tabla 13. La Tabla 13 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y que corresponde a un construcción de F_0 precursor que también incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 13. Utilización de inserciones de aminoácido para orientar proteínas F para aceptar enlaces disulfuro inter-intra-protómero, o combinaciones de los mismos.

Par(es) de residuos de proteína F	Sustituciones correspondientes a SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO
155 y 290 (Intra); y 146 y 460 (Inter); inserción G entre las posiciones 460/461	S155C y S290C; y S146C y N460C; inserción G entre las posiciones 460/461	258
155 y 290 (Intra); y 345 y 454 (Inter); inserción C entre las posiciones 453/454	S155C y S290C; y N345C y N454G; inserción C entre las posiciones 453/454	259
155 y 290 (Intra); y 374 y 454 (Inter); inserción C entre las posiciones 453/454	S155C y S290C; y T374C y N454G; inserción C entre las posiciones 453/454	260
155 y 290 (Intra); y 239 y 279 (Inter); inserción C entre las posiciones 238/239	S155C y S290C; y S238G y Q279C; inserción C entre las posiciones 238/239	261
155 y 290 (Intra); y 493 pares con inserción C entre las posiciones 329/330	S155C y S290C; y S493C pares con inserción C entre las posiciones 329/330	262
183 y 428 (Inter), inserción G entre las posiciones 182/183	N183C y N428C; inserción G entre las posiciones 182/183	296
183 y 428 (Inter), inserción C entre las posiciones 427/428	N183C y N427G; inserción C entre las posiciones 427/428	297
155 y 290 (Intra); y 183 y 428 (Inter); inserción G entre las posiciones 182/183	S155C y S290C; y N183C y N428C; inserción G entre las posiciones 182/183	298
155 y 290 (Intra); y 183 y 428 (Inter); inserción C entre las posiciones 427/428	S155C y S290C; y N183C y N427G; inserción C entre las posiciones 427/428	299
145 y 460 (Inter), inserción AA entre las posiciones 146/147	S145C y 460C; inserción AA entre las posiciones 146/147	338
183 y 423 (Inter), inserción AAA entre las posiciones 182/183	N183C y K423C; inserción AAA entre las posiciones 182/183	339
330 y 430 (Inter); inserción CAA entre las posiciones 329/330	A329C y S430C; y una inserción CAA entre las posiciones 329/330	340

Sustituciones de relleno de cavidad

La comparación de la estructura cristalina de la proteína F de RSV en complejo con Fab D25 (*es decir,* en una conformación de prefusión) con la estructura de la proteína F de RSV de posfusión (descrita, *p. ej.,* en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011; las coordenadas estructurales de la proteína F de RSV en su conformación de

postfusión están depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) como Acceso de PDB Nº 3RRR) identifica varias cavidades o bolsas internas en la conformación de prefusión que deben colapsar para que F transite a la conformación de postfusión. Estas cavidades se enumeran en la Tabla 14. Por consiguiente, el relleno de estas cavidades internas estabiliza F en el estado de prefusión, al prevenir la transición a la conformación de postfusión. Las cavidades se llenan al sustituir aminoácidos con cadenas laterales gryes por aquellas con cadenas laterales pequeñas. Las cavidades pueden ser cavidades intra-protómero o cavidades inter-protómero. Un ejemplo de una modificación de relleno de cavidad de F de RSV para estabilizar la proteína RSV en su conformación de prefusión es el mutante A190F/V207L.

Utilizyo esta estrategia, se identificaron varias modificaciones de relleno de cavidad para estabilizar la proteína F de RSV en su conformación de prefusión. Estas modificaciones, se indican en la Tabla 14. La Tabla 14 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas y correspondiente a un construcción de F_0 precursor que incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 14. Sustitución de aminoácido de relleno de cavidad ejemplar

Cavidad	Sustituciones de A.A.	SEQ ID NO:
Ser190 y Va1207	190F y 207L	191
Val207	207L y 220L	193
Ser190 y Val296	296F y 190F	196
A1a153 y Va1207	220L y 153W	197
Va1207	203W	248
Ser190 y Va1207	83W y 260W	192
Val296	58W y 298L	195
Val90	87F y 90L	194

A las cavidades indicadas se las alude por un residuo pequeño que colinda la cavidad que puede ser mutada a un residuo más grye para rellenar la cavidad. Se entenderá que otros residuos (además de la cavidad que se menciona después) también se podrían mutar para rellenar la misma cavidad.

Sustituciones de reempaquetamiento

Adicionalmente, la conformación de prefusión de la proteína F de RSV se puede estabilizar al aumentar las interacciones de residuos vecinos, tal como al potenciar las interacciones hidrófobas o la formación de enlaces hidrógeno. Además, la conformación de prefusión de la proteína F de RSV se puede estabilizar al reducir interacciones desfavorables o repulsivas de los residuos vecinos que conducen a la metaestabilidad de la conformación de prefusión. Esto se puede lograr al eliminar agrupaciones de residuos similarmente cargados. Ejemplos de modificaciones de este tipo se indican en la Tabla 15. La Tabla 15 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y correspondiente a una construcción de F_0 precursor que incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 15. Sustituciones de Aminoácido de Reempaquetamiento

Sustituciones	SEQ ID NO
I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	227
I64L, I79L, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, I214L	228
I64W, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	229
I79V, Y86F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	230
I64V, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199Y, L203F, V207L I214L	231
I64F, I79V, Y86W, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L	232
I64L, I79V, Y86W, L193V, L195F, I199F, L203F, V207L, I214L	233
V56I, T58I, V164I, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296I, A298I	234
V56I, T58I, V164I, V179L, T189F, I291V, V296I, A298I	235
V56L, T58I, L158W, V164L, I167V, L171I, V179L, L181F, V187I, I291V, V296L	236

V56L, T58I, L158Y, V164L, I167V, V187I, T189F, I291V, V296L	237
V56I, T58W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V1871, I291V, V296I	238
V56I, T58I, I64L, I79V, Y86W, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, A298I	239
V56I, T58I, I79V, Y86F, V164I, V179L, T189F, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, I291V, V296I, A298I	240
V56I, T58W, I64L, I79V, Y86W, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V1871, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, 1291V, V296I	241
V561, T58W, I79V, Y86F, V164I, I167F, L171I, V179L, L181V, V187I, L193V, L195F, Y198F, I199F, L203F, V207L, I214L, 1291V, V296I	242
D486N, E487Q, D489N, y S491A	249
D486H, E487Q, y D489H	250
T400V, D486L, E487L, y D489L	251
T400V, D486I, E487L, y D489I,	252
T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, K498L	253
T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, y K498L	254
K399I, T400V, S485I, D486L, E487L, D489L, Q494L, E497L, y K498L	255
K399I, T400V, S485I, D486I, E487L, D489I, Q494L, E497L, y K498L	256
L375W, Y391F, y K394M	286
L375W, Y391F, y K394W	287
L375W, Y391F, K394M, D486N, E487Q, D489N, y S491A	288
L375W, Y391F, K394M, D486H, E487Q, y D489H	289
L375W, Y391F, K394W, D486N, E487Q, D489N, y S491A	290
L375W, Y391F, K394W, D486H, E487Q, y D489H	291
L375W, Y391F, K394M, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, y K498M	292
L375W, Y391F, K394M, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, y K498M	293
L375W, Y391F, K394W, T400V, D486L, E487L, D489L, Q494L, y K498M	294
L375W, Y391F, K394W, T400V, D486I, E487L, D489I, Q494L, y K498M	295
F137W y R339M	326
F137W y F140W	327
F137W, F140W, y F488W	328
D486N, E487Q, D489N, S491A, y F488W	329
D486H, E487Q, D489H, y F488W	330
T400V, D486L, E487L, D489L, y F488W	331
T400V, D486I, E487L, D489I, y F488W	332
D486N, E487Q, D489N, S491A, F137W, y F140W	333
D486H, E487Q, D489H, F137W, y F140W	334
T400V, D486L, E487L, D489L, F137W, y F140W	335
L375W, Y391F, K394M, F137W, y F140W o	336
L375W, Y391F, K394M, F137W, F140W, y R339M	337

Mutaciones de glicosilación

Adicionalmente, la introducción de sitios de glicosilación N-enlazados que serían accesibles al disolvente en la conformación F de RSV de prefusión pero inaccesible al disolvente en la conformación de F de RSV de postfusión puede estabilizar F de RSV en el estado de prefusión al prevenir la adopción del estado de postfusión. Para crear un sitio de glicosilación N-enlazado, se puede introducir la secuencia Asn-X-Ser/Thr (en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro). Esto se puede lograr mediante la sustitución de dos residuos de aminoácido Ser/Thr C-terminales a un residuo Asn nativo, o mediante la sustitución de dos residuos de aminoácido Asn N-terminales a un residuo Ser/Thr nativo, o mediante la sustitución tanto de un residuo Asn como Ser/Thr separado por un aminoácido no prolina.

Utilizyo esta estrategia, se identificaron varias ubicaciones para los sitios de glicosilación N-enlazados que serían accesibles al disolvente en la conformación F de RSV de prefusión pero inaccesibles al disolvente en la conformación F de RSV de postfusión. Estas modificaciones se indican en la Tabla 16. La Tabla 16 también enumera la SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas y correspondientes a un construcción de F_0 precursor que incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de trimerización (un dominio Foldon) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his

(HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))).

Tabla 16. Glicosilación N-enlazada Ejemplar

Posición de glicosilación N-enlazada	Sustituciones ejemplares	SEQ ID NO ejemplar
506	I506N y K508T	198
175	A177S	199
178	V178N	200
276	V278T	203
476	Y478T	204
185	V185N y V187T	214
160	L160N y G162S	215
503	L503N y una F505S	216
157	V157N	217

Ejemplo 3

Estabilización del lóbulo proximal a la membrana de antígenos PreF

Como se discutió en anteriormente, la estructura cristalina de la proteína F de RSV en complejo con Fab D25 (*es decir,* en una conformación de prefusión) comparada con la estructura de la proteína F de RSV de postfusión ((descrita, *p. ej.,* en McLellan *et al., J. Virol.,* 85, 7788, 2011, con coordenadas depositadas como Acceso de PDB Nº 3RRR)) muestra reordenamientos estructurales drásticos entre las conformaciones de pre- y post-fusión en el lóbulo distal de la membrana. En base a una comparación de las estructuras F de RSV de pre- y post-fusión, existen dos regiones que se someten a cambios conformacionales gryes, ubicados en los extremos N y C de la subunidad F_1. Por ejemplo, cómo se ilustra en la FIG. 2, las posiciones 137-216 y 461-513 del polipéptido F_1 se someten a reordenamiento estructural entre las conformaciones de proteína de Pre- y Post-F, mientras que las posiciones 271-460 del polipéptido F_1 permanecen relativamente sin cambio. Este ejemplo ilustra varias estrategias para estabilizar la región C-terminal de F_1, que incluye el lóbulo próximal de la membrana de la proteína F de RSV. Se han identificado diversas estrategias, que incluyen la introducción de un dominio de trimerización (como se discute anteriormente), la introducción de pares de cisteína que pueden formar un enlace disulfuro que estabiliza la región C-terminal de F1 y la introducción de un dominio de transmembrana (*p. ej.,* para aplicaciones que incluyen un antígeno PreF unido a la membrana).

Enlaces disulfuro

Una estrategia para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F es introducir una o más sustituciones de cisteína que introducen un enlace disulfuro que estabiliza la porción C-terminal de F_1 (por ejemplo, para una aplicación que incluye un antígeno PreF soluble). Una estrategia de este tipo se puede combinar con cualquiera de las modificaciones de estabilización proporcionadas en la presente, por ejemplo, las descritas en el Ejemplo 2, tal como una proteína F_1 con una sustitución de cisteína S155C/S290C. Una estrategia incluye la introducción de dos residuos cisteína que están dentro de una distancia suficientemente cercana para formar un enlace disulfuro inter-protómero que enlaza la región C-terminal de la proteína F_1 en la conformación de prefusión. Un enlace disulfuro inter-protómero se formaría entre protómeros adyacentes dentro del trímero y, por lo tanto, reticularía los tres protómeros conjuntamente. Utilizyo los métodos descritos anteriormente, se determinó que varios pares de residuos de la proteína F de RSV están en bastante estrecha proximidad en la conformación de prefusión, para formar un enlace disulfuro inter-protómero si las cisteínas se introdujeron en las posiciones de pares de residuos correspondientes.

Ejemplos de sustituciones de cisteína que se pueden introducir para generar un enlace disulfuro que estabiliza el lóbulo proximal a la membrana incluyen las sustituciones de cisteína en los pares de residuos:

(a) 486 y 487

(b) 486 y 487; con una inserción P entre las posiciones 486/487

(c) 512 y 513

(d) 493; inserción C entre 329/330

(e) 493; inserción C entre 329/330, e inserción G entre 492/493

Además, la longitud del polipéptido F_1 se puede variar, dependiendo de la posición del par de cisteínas C-terminales. Por ejemplo, el polipéptido F_1 puede incluir las posiciones 137-481, que eliminan la hélice α10 del

polipéptido F_1.

Ejemplos de construccións que contienen modificaciones que incluyen cisteínas en estos pares de residuos, así como la descripción adicional se enumera en la Tabla 17. La Tabla 17 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y correspondiente a una construcción de F_0 precursor que también incluye un péptido señal, el polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (con posiciones variantes).

Tabla 17. Enlaces disulfuro para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de proteína F

Sustituciones/inserción	Descripción	Posiciones de F_1	SEQ ID NO
D486C/E487C; S155C/S290C	El mutante D486C y E487C permiten la formación de enlace disulfuro inter-protómero, mientras que las mutaciones S155C/S290C estabilizan el formato de prefusión, este construcción no tiene un Foldon o hélice alfa-10.	137-481	304
S155C/S290C; D486C/E487C; inserción P entre las posiciones 486/487	El mutante D486C y E487C debe permitir la formación de enlace de disulfuro de inter-protómero mientras que las mutaciones S155C/S290C estabilizan el formato de prefusión, este construcción no tiene un Foldon o hélice alfa-10.	137-481	305
N183C/N428C; D486C/E487C; inserción G entre 182/183	El mutante D486C y E487C deberían permitir la formación de enlace disulfuro inter-protómero mientras que las mutaciones 183C y 428C estabilizan el formato de prefusión. Esta construcción elimina la secuencia Foldon y la secuencia alfa-10.	137-481	306
N183C/K427G; inserción C entre 247/428; D486C/E487C P; inserción entre las posiciones 486/487	El mutante D486C y E487C deberían permitir la formación de enlace disulfuro inter-protómero mientras que las mutaciones 183C y 428C estabilizan el formato de prefusión. Esta construcción elimina la secuencia Foldon y la secuencia alfa-10.	137-481	307
V402C/L141C; L512C/L513C	El 141C y 402C estabilizan la forma de prefusión al bloquear el péptido de fusión. Si bien el 512C y 513C crean un enlace disulfuro inter-protómero; esta construcción no tiene un dominio Foldon.	1-513	308
S155C/S290C;V402C/L 141C L512C/L513C	El 141C y 402C estabilizan la forma de prefusión al bloquear el péptido de fusión en unión con el S155C/S290C. Si bien el 512C y 513C crean un enlace disulfuro inter-protómero, la secuencia Foldon es eliminada.	1-513	309
S155C/S290C;S493C; inserción C entre 329/330	La eliminación del "foldon" y la facilitación de la estabilización del enlace disulfuro intermolecular mientras que mutaciones S155C/S290C estabilizan el formato de prefusión.	137-491	310
S155C/S290C;S493C; inserción C entre 329/330; inserción G entre 492/493	La eliminación del "foldon" y la facilitación de la estabilización del enlace disulfuro intermolecular mientras que las mutaciones S155C/S290C estabilizan el formato de prefusión.	137-491	311

Dominios de transmembrana

Otra estrategia para estabilizar el lóbulo proximal a la membrana de la proteína F es incluir un dominio de transmembrana en la proteína F_1, por ejemplo, para una aplicación que incluye un antígeno PreF anclado a la membrana. Por ejemplo, la presencia de las secuencias de transmembrana es útil para la expresión como una proteína de transmembrana para la preparación de vesícula de membrana. El dominio de transmembrana se puede enlazar a una proteína F_1 que contiene cualquiera de las mutaciones estabilizantes proporcionadas en la presente, por ejemplo, las descritas en el Ejemplo 2, tal como una proteína F_1 con una sustitución de cisteína S155C/S290C. Adicionalmente, el dominio de transmembrana se puede enlazar además a la cola citosólica de F_1 de RSV. Ejemplos de construcciones de F_0 precursor que incluyen un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (posiciones 137-513), un dominio de transmembrana de RSV se proporcionan como SEQ ID NOs: 323 (sin un dominio citosólico) y 324 (con un dominio citosólico).

Ejemplo 4

Antígenos PreF de cadena sencilla

Este ejemplo ilustra proteínas F de RSV recombinantes que carecen de los sitios de segmentación de furina nativos, de modo que el protómero de proteína F se forma como una cadena polipeptídica sencilla, en lugar de un heterodímero F_2/F_1.

La Tabla 18 enumera varios antígenos PreF de cadena sencilla que incluyen la deleción de las posiciones 98-149 de F, que elimina los dos sitios de escisión de furina, el polipéptido pep27 y el péptido de fusión. Las porciones restantes de los polipéptidos F_1 y F_2 se unen por un enlazador. Adicionalmente, se pueden emplear varias estrategias para estabilizar las construcciones de cadena sencilla en una conformación de prefusión, incluyendo el uso de las estrategias descritas en los ejemplos 2 y 3, anteriores. La Tabla 18 también enumera una SEQ ID NO que contiene las sustituciones indicadas, y correspondiente a un construcción de F_0 precursor que también incluye un péptido señal, polipéptido F_2 (posiciones 26-109), polipéptido pep27 (posiciones 110-136), polipéptido F_1 (con posiciones variantes).

Tabla 18. Antígenos PreF de cadena sencilla

Sustituciones	Discusión	Enlazador F_2/F_1	Estabilización C-term	SEQ ID NO
S155C/S290C L373RΔ98-149	(A) La exposición razonada para este construcción es crear una molécula de fusión de RSV de cadena sencilla, eliminar la señal de localización de núcleo (L373R), y el péptido de fusión, mientras que las mutaciones S155C/S290C estabilizan el formato de prefusión	GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 356)	Foldon	313
S155C/S290C L373RΔ98-149	Lo mismo que (A)	GSGNWGLGG(SEQ ID NO: 357)	Foldon	314
S155C/S290C L373RΔ98-149	Lo mismo que (A)	GSGNIGLGG (SEQ ID NO: 358)	Foldon	315
S155C/S290C L373R Δ98-149	Lo mismo que (A)	GSGGNGIGLGG (SEQ ID NO: 359)	Foldon	316
S155C/S290C L373R Δ98-149	Lo mismo que (A)	GSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 360)	Foldon	317
S155C/S290C L373R Δ98-149	Lo mismo que (A)	GSGNVLGG (SEQ ID NO: 361)	Foldon	318
S155C/S290C L373R Δ98-149	(B) La exposición razonada para este construcción es crear una molécula de fusión de RSV de cadena sencilla, eliminar la señal de localización de núcleo y el péptido de fusión y también la hélice alfa 10 y el Foldon, mientras que las mutaciones S155C/S290C se estabilizan en el formato de prefusión	GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 362)	D486C/E487C; inserción P entre las posiciones 486/487	319
S155C/S290C/ L373R Δ98-149	Lo mismo que (B)	GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 363)	L512C/L513C	320
S155C/S290C/ L373R Δ98-149	Lo mismo que (A)	GSGNIGLGG (SEQ ID NO: 364)	TM	322

Ejemplo 5

Proteína F de RSV estabilizada con un enlace disulfuro y un dominio de trimerización

Este ejemplo ilustra la producción de una proteína F de RSV estabilizada con un enlace disulfuro y un dominio de trimerización. Como se ilustra en la FIG. 10, los residuos de serina en las posiciones 155 y 290 (indicadas por las flechas y resaltado en rojo en los diagramas de cinta) están adyacentes entre sí en la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, pero no en la conformación de postfusión de la proteína F de RSV. Además, las cadenas laterales de estos residuos se orientan una hacia la otra. Sin embargo, las cadenas laterales de los residuos adyacentes a serina 155, valina 154 y lisina 156, se orientan alejadas de la cadena lateral de la serina 290. A la vista de estos descubrimientos, se construyó una proteína F de RSV recombinante con las sustituciones S155C y S290C. Se esperó que los residuos cisteína en esta construcción 155/290 formaría un enlace disulfuro que bloquearía la proteína F de RSV recombinante en la conformación de prefusión, pero que la incorporación de cisteínas en las posiciones 154 o 156 (en lugar de la posición 155) no lograría producir un

enlace disulfuro estabilizante.

Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido F_0 de RSV nativo se mutó utilizyo técnicas de biología molecular estándares para codificar la proteína F de RSV denominada RSVF(+)FdTHS S155C, S290C, y expuesta como SEQ ID NO: 185:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDA
KVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGV
GSAIASGVAVCKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAWSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNI
ETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSN
RVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD
ELL**SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL**GGLVPRGSHHHHHHSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 185).

RSVF(+)FdTHS S155C, S290C incluye un péptido señal (residuos 1-25), polipéptido F_2 (residuos 26-109), polipéptido pep27 (residuos (110-136), polipéptido F_1 (residuos 137-513), dominio Foldon (residuos 514-544) y un sitio de escisión de trombina (LVPRGS (posiciones 547-552 de SEQ ID NO: 185)) y etiquetas de purificación (etiqueta his (HHHHHH (posiciones 553-558 de SEQ ID NO: 185)) y Strep Tag II (SAWSHPQFEK (posiciones 559-568 de SEQ ID NO: 185))). También se generaron construcciónes de control con las sustituciones V154C o K156C en lugar de la sustitución S155C.

Cuyo se expresa en células, RSVF(+)FdTHS S155C, S290C se procesó y se expresó como una proteína F de RSV estable y soluble; sin embargo, los construcciones de control con las sustituciones 154/290 o 156/290 no lograron expresarse (probablemente debido a que no lograron plegarse en una conformación soluble) (véase la FIG. 10).

La construcción RSVF(+)FdTHS S155C, S290C se purificó y se testó en cuanto a la unión del anticuerpo a los anticuerpos específicos de prefusión AM22 y D25, así como al anticuerpo 131-2a (que une el sitio antigénico I, presente en las conformaciones F de RSV de pre- y post-fusión), motavizumab y palivizumab (que une el sitio antigénico II, presente en las conformaciones F de RSV de pre- y post-fusión) y el anticuerpo 101F (que une el sitio antigénico IV, presente en las conformaciones F de RSV de pre- y post-fusión). Como se muestra en la FIG. 11 (gráfica de la izquierda), todos estos anticuerpos se unieron específicamente a la construcción RSVF(+)FdTHS S155C, S290C purificada, indicyo que RSVF(+)FdTHS S155C, S290C mantiene una conformación de prefusión. Los resultados indican, además, que esta construcción mantiene los sitios antigénicos I, II y IV, comunes a ambas conformaciones de pre- y post-fusión de F de RSV.

Para demostrar que RSVF(+)FdTHS S155C, S290C purificado está en una conformación trimérica, esta construcción se hizo pasar sobre una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. Como se muestra en la FIG. 11 (gráficas de la derecha) una preparación de RSVF(+)FdTHS S155C, S290C purificado eluyó en un solo pico correspondiente al peso molecular de la proteína F trimérica. Por el contrario, una preparación de una construcción de control que carece de las sustituciones S155C y S290C, que no se espera que sea estabilizada en la conformación de prefusión, eluyó en múltiples picos, indicyo la presencia de rosetas de proteína F activada y agregados, indicyo que esta construcción de control no es estable en una conformación de prefusión homogénea.

Para confirmar adicionalmente que la construcción RSVF(+)FdTHS S155C, S290C se estabiliza en una conformación de prefusión, se realizaron estudios de microscopía electrónica (FIG. 12) y demuestran que RSVF(+)FdTHS S155C, S290C forman una población homogénea de estructuras con una conformación similar a la de la conformación de prefusión de F de RSV, y significativamente diferente de aquella de la proteína F de postfusión (imagen derecha, de Martin *et al.*, J. Gen. Virol., 2006).

Se realizaron estudios de cristalografía para demostrar que RSVF(+)FdTHS S155C, S290C purificado es homogéneo en solución. La formación de cristales en solución acuosa es un test riguroso para la homogeneidad de una proteína en solución. La FIG. 15 muestra fotografías de los cristales formados por RSVF(+)FdTHS S155C, S290C purificado en tampón acuoso que contiene sulfato de litio 0.2 M, tartrato de Na/K 1.64 M y CHES 0.1 M a pH 9.5. La formación de cristales de RSVF(+)FdTHS S155C, S290C en tampón acuoso demuestra que esta proteína es sustancialmente homogénea en solución.

Ejemplo 6

Inducción de una respuesta inmune neutralizante utilizyo un antígeno PreF

Este ejemplo ilustra el uso de un antígeno PreF para inducir una respuesta inmune neutralizante de RSV en un sujeto.

Ratones CB6F1/J libres de patógeno de ocho semanas de edad (Jackson Labs) se dividieron en 5 grupos de 10 cada uno y se inmunizaron con los siguientes regímenes:

1) A2 de RSV vivos (RSV) a razón de $5x10^6$ ufp intranasalmente;

2) RSV precipitado con aluminio inactivado con formalina (F1-RSV) intramuscularmente (IM);

3) F de RSV (RSVF(+)FdTHS S155C, S290C de prefusión estabilizada; prefusión F) 20 μg en poli I:C 50 μg IM;

4) trímero F de RSV de postfusión ((RSV de postfusión) 20 μg en Poli I:C 50 μg IM, y

el Grupo 1 (RSV vivo) se infectó una vez en el tiempo 0, y todos los otros grupos se inmunizaron a las 0 y 3 semanas. El suero se obtuvo en la semana 5, dos semanas después de la 2ª inyección IM o cinco semanas de post-infección por RSV. La actividad neutralizante se determinó mediante el siguiente método: Los sueros se distribuyeron como diluciones de cuatro veces de 1:10 a 1:40960, mezclados con un volumen igual de genes F prototípicos que expresan mKate-RSV recombinante ya sea de la cepa A2 (subtipo A) o 18537 (subtipo B) y la proteína fluorescente Katushka, y se incubaron a 37 °C durante una hora. A continuación, 50 μl de cada una de las mezclas de dilución de suero/virus se añadió a las células HEp-2 que se han sembrado a una densidad de $1.5xl0^4$ en 30 μl de MEM (medio esencial mínimo) en cada uno de los pocillos de las placas de fondo óptico negro de 384 pocillos, y se incubaron durante 20-22 horas antes del análisis espectrofotométrico en Ex 588 nm y Em 635 nm (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA 94089). La CI50 para cada una de las muestras se calculó mediante el ajuste de curva y la regresión no lineal utilizyo GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA). Los valores p se determinaron mediante el test t de Student. El método anterior para medir la neutralización de RSV se realizó sustancialmente como se describe previamente (véase, p. ej., Chen et al., J. Immunol Methods, 362:180-184, 2010), excepto que la lectura fue mediante un lector de placa fluorescente en lugar de citometría de flujo.

Utilizyo este ensayo, generalmente las respuestas de anticuerpo por encima de ~100 CE_{50} serían consideradas que son protectoras. Como se muestra en las FIGs. 13 y 14, a ratones a los que se administró una proteína F RSV estabilizada en una conformación de prefusión (RSV F (RSVF(+)FdTHS S155C, S290C) produjo una respuesta inmune neutralizante a A de RSV ~15 veces más grye que la producida por los ratones a los que se administró una proteína F de RSV en una conformación de postfusión, y una respuesta a B de RSV ~ 5 veces más grye que la producida por los ratones a los que se administró una proteína F de RSV en una conformación de postfusión. La FIG. 13 muestra los resultados después de 5 semanas post-inmunización inicial, y la FIG. 14 muestra los resultados después de 7 semanas de post-inmunización. Los valores de CI50 inducidos medios también se muestran en las FIGs. 13 y 14. La diferencia en la neutralización entre los subgrupos A y B de RSV no es sorprendente, ya que la construcción RSVF (+) FdTHS S155C, S290C se deriva de una proteína F de un subgrupo A de RSV. Se espera que la inmunización con un construcción correspondiente derivada de una cepa B de RSV generaría sueros neutralizantes más específicos para B de RSV (véase la FIG. 41).

Además, se demostró que la F de prefusión estabilizada se puede formular en aluminio así como Poli I:C y puede conservar la inmunogenicidad conferida por las respuestas de anticuerpo al sitio antigénico Ø. Ratones BALB/c se inmunizaron con 20 μg de la versión DS S155C/S290C de F de prefusión estabilizada derivada del subtipo A y formulada con aluminio (gel de hidróxido de aluminio 10 mg/ml, Brenntag, Frederikssund, Dinamarca) o Poli I:C. Los ratones se inocularon a las 0 y 3 semanas, y en el momento de 5 semanas (2 semanas después de la segunda inyección), se obtuvo suero para ensayos de neutralización (véase la FIG. 42). Los resultados demuestran que la inmunización con una proteína F de RSV estabilizada en una conformación de prefusión produce una respuesta inmune protectora a RSV.

Ejemplo 7

Tratamiento de sujetos con los antígenos descritos

Este ejemplo describe métodos que se pueden utilizar para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección por RSV mediante la administración de uno o más de los antígenos PreF descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye un antígeno PreF. En ejemplos particulares, el método incluye la detección de un sujeto que tiene, se cree que tiene o está en riesgo de tener (por ejemplo, debido a la inmunidad deteriorada, estado fisiológico, o exposición a RSV) una infección por RSV. Los sujetos de un estado de infección desconocido se pueden examinar para determinar si tienen una infección, por ejemplo, utilizyo tests serológicos, examen físico, ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA), detección radiológica u otra técnica de diagnóstico conocida para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. En algunos ejemplos, se selecciona un sujeto que tiene una infección por RSV o está en riesgo de adquirir una infección por RSV. Los sujetos en los que se encuentra que (o se conoce que) tienen una infección por RSV y, con ello, pueden ser tratados mediante la administración de los antígenos PreF descritos, o un ácido nucleico o un vector viral que codifica, expresa o incluye el antígeno PreF se seleccionan para recibir los antígenos PreF, o un ácido nucleico o

un vector viral que codifica, expresa o incluye un antígeno PreF. También se pueden seleccionar sujetos quienes están en riesgo de desarrollar una infección por RSV, por ejemplo, las personas de edad avanzada, los inmunocomprometidos y los muy jóvenes, tales como niños.

A los sujetos seleccionados para el tratamiento se les puede administrar una cantidad terapéutica de antígenos PreF descritos. Una composición inmunogénica que incluye el antígeno PreF se puede administrar en dosis de 0.1 µg por kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 0.1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, 0.1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 µg/ kg de peso corporal por dosis, 1 µg/kg de peso corporal - 100 µg/kg de peso corporal por dosis, 100 µg/kg de peso corporal - 500 µg/kg de peso corporal por dosis o 500 µg/kg de peso corporal - 1000 µg/kg de peso corporal por dosis o incluso mayores. En algunas realizaciones, aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o aproximadamente 100 µg del antígeno PreF se incluye en la composición inmunogénica que se administra al sujeto en una sola dosis. La composición inmunogénica se puede administrar en varias dosis, por ejemplo continuamente, diariamente, semanalmente o mensualmente. El modo de administración puede ser cualquiera utilizado en la técnica, tal como la administración nasal. La cantidad de agente administrado al sujeto se puede determinar por parte de un médico, y puede depender del sujeto particular tratado. Cantidades ejemplares específicas se proporcionan en la presente (pero la descripción no se limita a dosis de este tipo).

Ejemplo 8

Proteína F de RSV estabilizada con un enlace disulfuro, sustituciones de relleno de cavidad y un dominio de trimerización

Este ejemplo ilustra la producción de una proteína F de RSV estabilizada con un enlace disulfuro y un dominio de trimerización.

La Figura 16 muestra el diseño de una proteína F de RSV recombinante estabilizada por mutaciones de enlace disulfuro modificadas por ingeniería genética S155C y S290C (denominadas "DS"), mutaciones de relleno de cavidad S190F y V207L (denominadas "Cav1"), y un dominio de trimerización heterólogo adjunto al extremo C del polipéptido F1 de la proteína F. La estructura tridimensional representada es la estructura F de RSV unida a D25, y se muestra con los dos de los protómeros exhibidos como una superficie molecular de color rosa y canela, y el tercer protómero exhibido como cintas. Se muestran los residuos N- y C-terminales de F_1 que se mueven más de 5 Å entre la conformación de pre- y post-fusión. Los recuadros muestran el enlace disulfuro modificado por ingeniería genética entre los residuos S155C y S290C, así como las mutaciones de cavidad de relleno de espacio S190F y V207L. Un modelo del dominio de trimerización de fibritina de fago T4 se muestra en la base del trímero de prefusión.

Una proteína F de RSV que incluye las sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L (Cav1) en el subtipo A de RSV humano, y el dominio foldon heterólogo C-terminal adjunto, se expresó y se purificó utilizyo los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 5, y se denomina RSV_A F(+)FdTHS DSCav1.

La caracterización antigénica de RSV_AF(+)FdTHS DSCav1 se muestra en la Figura 17. Las velocidades de asociación y disociación de Fab de AD25, AM22, 5C4, 101F, motavizumab y palivizumab soluble con RSV_AF(+)FdTHS DSCav1 inmovilizado se midieron utilizyo un instrumento OctetRED 384™ (ForteBio, Menlo Park, CA). Se proporcionan las constantes de disociación de equilibrio para cada uno de los anticuerpos.

La pureza de RSV_AF(+)FdTHS DSCav1 se ilustra mediante cromatografía de exclusión por tamaño (FIG. 18). La proteína purificada, después de la escisión de trombina para eliminar las etiquetas, se hizo pasar sobre una columna de exclusión por tamaño 16/70 Superose 6. El volumen de elución es consistente con un trímero glicosilado.

Las características antigénicas y físicas, incluyendo el rendimiento de los plásmidos transitoriamente expresados, la antigenicidad contra varios sitios antigénicos y la retención de la unión de D25 (proporcionada como una cantidad fraccionaria) después de 1 hora de incubación a diversas temperaturas (NaCl 350 mM pH 7.0, a 50 °C, 70 °C o 90 °C), pHs (NaCl 350 mM pH 3.5 o pH 10, a 25 °C) y la osmolalidad (osmolalidad 10 mM, 3000 mM, pH 7.0, a 25 °C), o a 10 ciclos de congelación-descongelación (en NaCl 350 mM pH 7.0), de las variantes RSV_A F(+)FdTHS estabilizadas por las mutaciones DS, Cav1 o DSCav1 se muestran en la FIG. 19. La variante de DSCav1 conserva el reconocimiento del sitio antigénico Ø, con estabilidad física mejorada, como es juzgado por la retención más alta de reactividad de D25 después de la exposición a extremos de temperatura, pH, osmolalidad y congelación-descongelación, que cualquiera de las variantes DS o Cav1.

Para investigar las propiedades estructurales del mutante de DSCav1, la estructura tridimensional de RSV_AF(+)FdTHS DSCav1 se determinó utilizyo la cristalografía de rayos X. La FIG. 20 muestra una representación de cinta de la estructura cristalina de 3.1 Å de RSV_AF(+)FdTHS DSCav1. Los colores más cálidos y las cintas más gruesas corresponden a factores B incrementados. A pesar de las mutaciones estabilizantes, el sitio antigénico Ø, en el ápice del trímero, conserva una flexibilidad significativa. La FIG. 21

muestra la comparación de la estructura de RSV_AF(+)FdTHS DSCav1 con la estructura de F de RSV unida a D25. La FIG. 22 resalta las mutaciones estabilizantes en la estructura RSV_AF(+)FdTHS DSCav1. La densidad de electrones observada correspondiente al enlace disulfuro entre los residuos cisteína 155 y 290 (izquierda), así como el residuo Phe190 de relleno de cavidad (derecha), indica que estas modificaciones están presentes en el cristal.

Para determinar la inmunogenicidad de la construcción RSV_AF(+)FdTHS DSCav1, se inoculó a ratones y primates no humanos con esta construcción y los sueros obtenidos de los animales inoculados se testaron en cuanto a la neutralización de RSV (FIGs. 23 y 24). Los ratones se inmunizaron y se testó la actividad de neutralización de los sueros resultantes, como se describe en el Ejemplo 6 anterior. Brevemente, diez ratones CB6 por grupo se inmunizaron con 10 µg de la proteína F de RSV indicada mezclada con 50 µg del adyuvante poli I:C. Las inmunizaciones se produjeron a las 0 y 3 semanas, y los sueros de la semana 5 y semana 7 se testaron en cuanto a la neutralización del subtipo A de RSV (RSV_A) y B (RSV_B). Los valores medios se indican por líneas rojas horizontales. A animales *Macaca mulata* de origen indio que pesaban 8.76-14.68 kg se les inyectaron intramuscularmente inmunógenos en la semana 0 y la semana 4. La sangre se recogió cada semana durante hasta 6 semanas. Cuatro macacos rhesus no tratados previamente con RSV por grupo se inmunizaron por vía intramuscular con 50 pg de la proteína F de RSV indicada mezclada con 500 pg del adyuvante poli I:C. Las inmunizaciones ocurrieron a las 0 y 4 semanas, y los sueros de la semana 6 se testaron en cuanto a la neutralización del subtipo A de RSV (izquierda) y B (derecha). Los valores medios se indican con líneas rojas horizontales. Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran que la construcción RSV_AF(+)FdTHS DSCav1 generó con éxito una respuesta neutralizante en ratones y en primates no humanos.

Ejemplo 9

Diseño Basado en la Estructura de una Vacuna de Glicoproteína de Fusión para el Virus Sincitial Respiratorio

Resumen. El virus sincitial respiratorio (RSV) es la causa principal de hospitalización para niños de menos de cinco años. Para inducir respuestas humorales protectoras contra el RSV, los esfuerzos se enfocaron en el sitio antigénico Ø, un sitio metaestable específico al estado de prefusión de la glicoproteína de fusión (F), ya que este sitio es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes de RSV altamente potentes inducidos por la infección natural. Se utilizó el diseño basado en la estructura para modificar por ingeniería genética versiones estabilizadas de F que conservaban el sitio antigénico Ø a los extremos de pH y temperatura. Seis estructuras cristalinas de F estabilizadas proporcionaron detalles a nivel atómico para los residuos cisteína introducidos y las cavidades hidrófobas rellenadas y reveló sutilmente las conformaciones F "de prefusión" diferentes. La inmunización con las variantes estabilizadas en el sitio Ø de RSV indujo - tanto en ratones como en primates no humanos – la actividad neutralizante específica de RSV 3-15 veces más alta que la inducida por F de RSV en su estado de postfusión. El diseño a nivel atómico para presentar un supersitio de vulnerabilidad viral puede, por lo tanto, tener un efecto transformativo en el desarrollo de la vacuna.

Introducción. Se estima que el virus sincitial respiratorio (RSV) es el responsable del 6.7 % de las muertes en niños de 1 mes a 1 año de edad y provoca mortalidad en exceso en las personas de edad avanzada a niveles comparables a los provocados por la infección con el virus de la influenza. Aunque la infección por RSV no induce inmunidad completamente protectora, los anticuerpos contra la glicoproteína de fusión (F) de RSV pueden prevenir la enfermedad grave en seres humanos, como se demuestra por la profilaxis pasiva con el anticuerpo dirigido a F, palivizumab (Synagis®).

El éxito demostrado de palivizumab ha derramado esfuerzos de vacuna dirigidos a inducir anticuerpos dirigidos contra F de RSV protectores. Estos esfuerzos se han complicado por la diversidad estructural de F de RSV, una proteína de fusión tipo I que adopta por lo menos dos conformaciones: un estado de prefusión metaestable y un estado de postfusión estable. Ambos estados comparten epítopos fijados como objetivo por anticuerpos neutralizantes, incluyendo el de palivizumab, y F de RSV de postfusión está siendo desarrollada como un cyidato de vacuna. Como se describe en la presente, se encontró que la diana dominante de los anticuerpos neutralizantes de RSV inducida por la infección natural reside principalmente en la conformación de prefusión de F de RSV, y los anticuerpos tales como AM22 y D25 (véanse, p. ej., los documentos US 12/600.950 y US 12/898325) - sustancialmente más potentes que palivizumab – fijan como objetivo el sitio antigénico Ø, un sitio metaestable específico a F de prefusión, que se ubica en el ápice distal de la membrana del trímero F de RSV de prefusión.

Para potenciar la inducción de estos anticuerpos potentes, las variantes solubles modificadas por ingeniería genética de F de RSV se diseñaron para exponer establemente el sitio antigénico Ø. Estas variantes se caracterizaron tanto antigénica como cristalográficamente, y se testaron en cuanto a la inmunogenicidad en ratones y primates no humanos. Los resultados proporcionan un discernimiento en la interfusión entre el diseño, la antigenicidad, la estructura y la inmunogenicidad que muestran cómo la modificación por ingeniería genética basada en la estructura preserva y presenta una diana antigénica apropiada que puede tener un efecto transformador en la inducción de las respuestas humorales protectoras.

La estrategia de vacuna basada en la estructura descrita en la presente incluía una estrategia de cuatro etapas: (1) para identificar un supersitio de vulnerabilidad viral fijado como objetivo por los anticuerpos con potente actividad neutralizante, (2) para determinar la estructura del supersitio en complejo con un anticuerpo representativo, (3) modificar por ingeniería genética la presentación estable del supersitio en ausencia del anticuerpo reconocido y (4) inducir altas respuestas protectoras de título a través de la inmunización con antígenos modificados por ingeniería genética que presentan el supersitio (FIG. 26).

Modificación por ingeniería genética de Antígenos F de RSV

Debido a su reconocimiento por los anticuerpos neutralizantes de RSV extraordinariamente potentes, el sitio antigénico Ø se eligió como el supersitio objetivo; su estructura en complejo con el anticuerpo D25 se describe en la presente (FIG. 26B). Para modificar por ingeniería genética variantes de F de RSV que presentaron establemente el sitio Ø, se analizó la estructura de F de RSV F unida por D25. Mecánicamente, existe un cierto número de maneras para estabilizar una conformación de proteínas. Se testaron mecanismos para estabilizar el sitio Ø sin comprometer su reconocimiento en combinación con un dominio de trimerización de fibritina de fago T4 ("foldon") (Efimov et al., J Mol Biol 242, 470 (1994); Boudko et al., European journal of Biochemistry / FEBS 269, 833 (2002)) adjunto al extremo C del ectodominio F de RSV (McLellan et al., J. Virol. 85, 7788 (2011)).

La introducción de pares de cisteína predichos para formar un enlace disulfuro en la conformación objetivo, pero ampliamente separada en conformaciones alternativas, es un enfoque para estabilizar una estructura seleccionada. Los carbonos β de los residuos de serina 155 y 290 están separados 4.4 Å, en la estructura de F de RSV unida de D25 (véase el Ejemplo 1) y separada 124.2 Å en la estructura de postfusión (McLellan et al., J. Virol. 85, 7788 (2011; descrita arriba y véanse las FIGs 27 y 32). Un mutante doble S155C-S290C, denominado "DS", formó trímeros F de RSV estables, expresados a razón de 1.4 mg/L, retuvieron el sitio antigénico Ø y fue homogéneo como se juzgó por la EM de tinción negativa (descrita arriba; véanse también las FIG 31, FIG 33). Otras modificaciones de cisteína, tales como aquellas entre las regiones F de RSV que son compatibles con los estados tanto de pre- como de post-fusión (p. ej., S403C y T420C), no estabilizaron el sitio antigénico Ø (FIG. 31). Un cierto número de modificaciones de cisteína dobles inter-subunitarias potenciales también se testó; ninguna de las sustituciones de cisteína dobles inter-subunitarias testadas, sin embargo, expresó más de 0.1 mg/L.

Las sustituciones hidrófobas de relleno de cavidad proporcionan otro medio para estabilizar una conformación selecta. La estructura F de RSV unida a D25 se analizó para las cavidades hidrófobas únicas a la conformación unida a D25 de F de RSV de las regiones colindantes que difirieron en los estados F de pre- y post-fusión. Un cierto número de cavidades de este tipo se identificó en la "cabeza" distal a la membrana de la estructura de prefusión, cerca del sitio de unión de D25, y se modelaron alteraciones hidrófobas para llenar estas cavidades. Las alteraciones S190F y V207L adoptaron conformaciones de cadena lateral prevalecientes con enfrentamientos mínimos, mientras que las alteraciones K87F, V90L, V220L y V296F mostraron menos compatibilidad estérica, se estimó el relleno de estas cavidades con pares de cambios. Un par S190F-V207L, que se denominó "Cav1" (FIG. 27), formó trímeros F de RSV estables, expresados a 2.2 mg/L, y retuvieron el sitio antigénico Ø (FIG. 31). Mientras tanto, las variantes K87F-V90L, S190F-V296F y V207L-V220L mostraron una retención potenciada del reconocimiento de D25, pero rendimientos menores que 0.1 mg/L del trímero F de RSV (FIG. 31).

Otras cavidades hacia el centro de F de RSV de prefusión estuvieron cercanas al péptido de fusión, el eje de trímero y un parche acídico que comprende los residuos Asp486, Glu487 y Asp489. Se modeló un cierto número de alteraciones de relleno de cavidad e incluyen F137W, F140W y F488W, y estas alteraciones se analizaron en combinación con D486H, E487Q y D489H (FIG. 31). De las seis combinaciones testadas, solamente dos (F488W y D486H-E487Q-F488W-D489H) expresaron niveles de trímero de F de RSV purificado en más de 0.1 mg/l y retuvieron el reconocimiento de D25. La variante D486H-E487Q-F488W-D489H, designada "TriC", formó trímeros F de RSV estables, expresados a 0.8 mg/l, y retuvieron el sitio antigénico Ø (FIG. 31, FIG. 27).

También se testo el impacto de desestabilización de la conformación de postfusión en la preservación del sitio antigénico Ø. V178N, del que se predijo que introducía un glicano N-enlazado compatible con la conformación de prefusión pero no con la conformación de postfusión de F, pareció estabilizar el sitio antigénico Ø, ni lo hizo V185E o I506K, que colocaría un ácido glutámico o una lisina en el interior del haz de seis hélices de postfusión (FIG. 31). Estas mutaciones probablemente dan como resultado alguna conformación intermedia de F de RSV que está "activada", pero es incapaz de adoptar la conformación de postfusión. En todo, se construyeron más de 100 variantes F de RSV, expresadas en un formato de transfección de 96 pocillos (Pancera et al., PLoS ONE 8, e55701 (2013)), y se testaron mediante ELISA para la unión a D25 y motavizumab. Quince construcciones fueron compatibles con la unión a D25, seis de las cuales conservaron el reconocimiento de D25 durante al menos 7 días a 4 ºC, y tres de éstas podrían ser purificadas para formar trímeros homogéneos que conservaron el sitio antigénico Ø (FIG. 31). Globalmente, se observó una fuerte correlación entre la retención de la unión a D25 durante al menos 7 días a 4 ºC en sobrenadantes de 96 pocillos y produjeron trímeros purificados de expresión y purificación a gran escala (FIG. 34).

Optimización Combinatoria de la Estabilidad del Sitio Ø

Las variantes DS, Cav1 y TriC exhibieron una diversidad de propiedades físicas y antigénicas. La variante DS fue la menos estable a los extremos de pH y temperatura, pero estaba más estabilizada permanentemente en el estado trimérico, mientras que la interconversión constante del trímero al agregado se observó para Cav1 y TriC. Para estimar si una variante más óptima de F de RSV podría obtenerse al combinar DS, Cav1 y TriC, se hicieron todas las combinaciones.

Las combinaciones generalmente mejoraron la retención de la reactividad de D25 a extremos físicos. Por lo tanto, por ejemplo, todas las combinaciones mostraron estabilidad mejorada a la incubación a 50 ºC o pH 10.0. Sin embargo, la baja tolerancia a la congelación-descongelación exhibida por TriC también se observó tanto en Cav1-Tric como en DS-Cav1-TriC. Globalmente, la combinación de DS-Cav1 apareció óptima en términos de rendimiento de trímero y estabilidad física a los extremos de temperatura, pH, osmolalidad y congelación-descongelación (FIG. 31, FIG. 35) y fue homogénea como se estimó por EM de tinción negativa (FIG. 33).

Análisis Cristalográfico

Para proporcionar una retroalimentación a nivel atómico, se determinaron las estructuras cristalinas de las variantes de F de RSV estabilizadas en el sitio Ø (FIG. 28). Las variantes DS, Cav1, DS-Cav1 y DS-Cav1-TriC cristalizaron todas en condiciones similares a tartrato 1.5 M pH 9.5, y estos cristales cúbicos difractaron los rayos X a resoluciones de 3.1 Å, 3.1 Å, 3.8 Å y 2.8 Å, respectivamente (FIG. 40). Las soluciones de reemplazo molecular se obtuvieron al utilizar la estructura F de RSV unida a D25 como un modelo de búsqueda, y estas revelaron un solo protómero de F de RSV en la unidad asimétrica, con el eje F trimérico alineado a lo largo del triple cristalográfico. Cristales tetragonales de Cav1 y cristales cúbicos de DS-Cav1 también se obtuvieron de las condiciones de sulfato de amonio 1.7 M pH 5.5, y estos difractaron a resoluciones de 2.4 Å y 3.0 Å, respectivamente (FIG. 40). El reemplazo molecular reveló la red tetragonal que tiene un trímero F de RSV completo en la unidad asimétrica y que está altamente relacionado con las redes cúbicas de tartrato. Globalmente, estas estructuras revelaron que las variantes F de RSV modificadas por ingeniería genética están sustancialmente en la conformación unida a D25 (las variantes F de RSV modificadas por ingeniería genética tuvieron desviaciones cuadráticas media C de la conformación unida a D25 entre 0.68-1.5 Å y de la conformación de postfusión de aproximadamente 30 Å).

Aunque la estructura de la variante DS (FIG. 28, columna más a la izquierda) fue estable como un trímero soluble, con los residuos sustituidos de cisteína en 155 y 290 en realidad formyo un enlace disulfuro que ampliamente previno la activación al estado de postfusión, gran parte de la porción distal a membrana del trímero F de RSV, incluyendo el sitio antigénico Ø, fue ya sea desordenado (residuos 63-72 y 169-216) o en una conformación diferente. Por lo tanto, por ejemplo, los residuos 160-168 en la estructura DS se extienden en la hélice α2 en lugar de formar una vuelta e iniciar la hélice α3 como en la estructura F unida a D25 (FIG. 28B, panel más a la izquierda). Una explicación no limitante de las diferencias entre la estructura DS y la estructura F de RSV unida a D25 es que la DS cristalizada está en una conformación que no se une a D25. Globalmente, la variante DS retuvo muchas de las características del estado de prefusión de F de RSV, incluyendo el péptido de fusión en el interior de la cavidad trimérica.

En comparación con DS, la estructura Cav1 (FIG. 28, 2ª y 3ª columnas) fue más ordenada en el ápice distal a la membrana, con la hélice α3, la horquilla β3/β4 y la hélice α4 claramente definidas. Los residuos 137-202, que contienen la sustitución de S190F, tuvieron una rmsd Cα de 0.6 Å cuyo se compara con la estructura F unida a D25. El grado más alto de orden estructural fue probablemente debido a la mutación S190F que rellenó una cavidad observada en la estructura F unida a D25, e incrementó los contactos van der Waals con los residuos Ile57, Lys176, Val192, Glu256, Ser259 y Leu260. La otra mutación del relleno de cavidad en Cav1, V207L, se desplazó 5.5 Å comparado con la estructura F unida a D25, con la porción C-terminal de la hélice α4 que se retuerce cerca de Pro205 y adopta distintas conformaciones en las dos condiciones de cristalización (FIG. 28B, 2º y 3er paneles desde la izquierda).

Una característica acentuante de la estructura Cav1 en la red cristalina tetragonal es el extremo C de F_2, que está desordenado en la estructura F unida a D25, pero en Cav1, se tuneliza en la cavidad trimérica a lo largo del péptido de fusión. Curiosamente, los extremos C-terminales con Ala107 y no Arg109, como se espera después de la escisión del sitio de furina (Arg106-Ala107-Arg108-Arg109). En la estructura Cav1, la carga positiva de Arg106 es desviada por un ion sulfato ordenado (FIG. 28C). Biológicamente, la posición interior del extremo C de F_2 puede desempeñar un papel en la activación de la conformación F de prefusión.

La comparación de las estructuras DS-Cav1 de las dos formas de cristal tetragonales (FIG. 28, 2ª y 3ª columnas desde la derecha) a aquellas de Cav1 reveló únicamente diferencias menores (rmsd Cα de 0.86 Å para residuos entre Cav1 y DS-Cav1 cultivados en condiciones de sulfato de amonio; rmsd Cα de 0.47 Å para 447 residuos en la red cúbica). Las diferencias más gryes se produjeron en el ápice F de RSV, que incluye el sitio antigénico Ø y, específicamente, en los residuos 64-73 y 203-216. Notablemente, la movilidad atómica (factor *B*) fue más alta en la región del ápice para todas las variantes estabilizadas en el sitio Ø, quizás indicativo de la flexibilidad

intrínseca del sitio Ø. De manera interesante, sin embargo, el sitio Ø tiene baja movilidad atómica cuyo se une por D25, revelyo la capacidad de D25 para estabilizar las conformaciones de F de RSV tanto totales como locales.

La estructura de la combinación triple DS-Cav1-TriC (FIG. 28, columna muy a la derecha) también fue altamente similar a otras estructuras variantes de F de RSV que contienen Cav1. Una diferencia en la densidad de electrones, sin embargo, correspondió a una extensión de la densidad débil en la región proximal a la membrana, que correspondió a las dimensiones del dominio de trimerización fibritina T4 (Stetefeld et al., Structure 11, 339 (2003)), que no es visible en otras estructuras F de RSV cristalizadas que contenían este dominio, incluyendo la estructura unida a D25. Pequeñas diferencias estructurales en el empaquetamiento probablemente permiten el ordenamiento parcial de este dominio (y también pueden tener en cuenta su límite de difracción incrementado de los cristales DS-Cav1-TRIC en relación con las otras variantes cúbicas), antes que diferencias en la interacción entre la F de RSV estabilizada con DS-Cav1-Tric y este dominio de trimerización.

En términos de las alteraciones TriC de los residuos 486-489, la sustitución F488W crítica se empaquetó directamente contra las sustituciones F488W de los protómeros vecinos del trímero F de RSV. La cadena lateral de indol de Trp488 apuntó hacia el ápice del trímero y también interacciones de apilamiento de anillo con la cadena lateral de 140Phe del péptido de fusión (FIG. 28C, panel muy a la derecha). Esta interacción del péptido de fusión, que no se observa en cualquiera de las estructuras que contienen Phe488, probablemente inhibe la extracción del péptido de fusión de la cavidad de trímero de prefusión, proporcionyo una exposición razonada estructural para la capacidad de la alteración F488W para estabilizar el estado de prefusión de F de RSV (FIG. 31).

Inmunogenicidad de F de RSV Estabilizada con el Sitio Antigénico Ø

Para evaluar el efecto de la estabilización del sitio Ø en la inducción de las respuestas humorales protectoras de RSV, ratones CB6 se inmunizaron con diversas formas de F de RSV, inyectyo a cada ratón 10 µg de F de RSV combinado con 50 µg del adyuvante poli I:C en las semanas 0 y 3, y se midió la capacidad de los sueros en la semana 5 de prevenir la infección por RSV de las células HEp-2. DS, Cav1 y TriC indujo cada uno altos títulos de actividad neutralizante (media geométrica en concentraciones efectivas de 50 % (CE_{50}) de 1826-2422). Este nivel fue ~ 3 veces más alto que el inducido por la F de postfusión (CE_{50} de 504), y ~ 20 veces más alto que el umbral protector. En comparación, DS-Cav1 indujo la actividad neutralizante de CE_{50} de 3937, aproximadamente 7 veces más alto que la F de posfusión y 40 veces más alto que el umbral protector (FIG. 29A). (Cuyo palivizumab (Synagis®) se dosifica en una concentración de 15 mg/kg, los niveles de suero están en ~40 µg/ml, que proporciona protección en niños contra una enfermedad grave. En el ensayo de neutralización, 40 pg/ml de palivizumab en el suero produce una CE_{50} de 100. Este título también está asociado con la protección completa de la infección del tracto respiratorio inferior en ratones y ratas algodoneras estimulados con RSV).

Para cuantificar la inducción de anticuerpos entre diferentes sitios en F de RSV de prefusión, se utilizaron formas ocluidas del sitio antigénico Ø de F de RSV. Ratones CB6 inmunizados con 20 µg de F de RSV unido por anticuerpos dirigidos al sitio antigénico Ø (que comprenden ~10 µg de F de RSV y ~10 µg del fragmento de unión a antígeno del anticuerpo) desarrollaron títulos de neutralización de media geométrica en la semana 5 CE_{50} de 911 y 1274 para los complejos AM22 y D25, respectivamente, aproximadamente el doble de aquella de la postfusión en 10 µg/ml y equiparable a aquellos inducidos por la postfusión de 20 µg/ml (FIG. 29A). Estos descubrimientos sugieren que los títulos muy altos inducidos por la inmunización con variantes F de RSV estabilizadas en el estado de prefusión - especialmente DS-Cav1 - fueron debido a los anticuerpos que fijan como objetivo el sitio antigénico Ø.

Para examinar la generalidad de la inducción del sitio Ø, macacos rhesus se inmunizaron con DS-Cav1, DS y formas de postfusión de F de RSV, inyectyo a cada macaco 50 µg de F de RSV mezclado con 500 µg de adyuvante de poli I:C las semanas 0 y 4 y midiendo la capacidad de los sueros en la semana 6 de inhibir la infección por RSV. Las proteínas formuladas retuvieron los perfiles antigénicos esperados como se mide por la unión a D25 (FIG. 38). DS y DS-Cav1 indujeron títulos medios geométricos de CE_{50} 1222 y 2578, respectivamente, aproximadamente 5 y 10 veces más altos que la F de postfusión (CE_{50} 287) (FIG. 29B), para de esta manera demostrar una conservación de la inmunogenicidad relativa de las diferentes formas del inmunógeno F de RSV entre ratones y primates, y la capacidad de DS-Cav1 de generar altos títulos protectores de RSV en un sistema inmune de primate.

Optimización de respuestas protectoras de F de RSV

La matriz de información (FIG. 26C) generada por la interfunción entre el diseño, las propiedades físicas y antigénicas, la estructura a nivel atómico y la inmunogenicidad proporciona una base para la optimización adicional (Nabel, Science 326, 53 (2009)). Por ejemplo, para obtener un discernimiento en la relación entre diversas propiedades antigénicas y físicas de Fs de RSV modificadas por ingeniería genética y la inducción de las respuestas protectoras de RSV, se pueden correlacionar las propiedades (FIG. 31) con la inmunogenicidad (FIG. 29). Correlaciones de este tipo indican la estabilidad del sitio Ø incrementada a extremos físicos (pero no el

rendimiento de trímero ni la afinidad de D25) deben incrementar los títulos protectores inducidos tras la inmunización (FIG. 30A), para de esta manera proporcionar un discernimiento de diseño en la optimización adicional. De manera similar, las correlaciones entre diversos estados conformacionales o regiones de F de RSV (FIG. 28) y la inmunogenicidad (FIG. 29) proporcionan un discernimiento de diseño en la conformación de F de RSV que proporciona las respuestas más protectoras. En este caso, los resultados indican que la potenciación de la imitación estructural del sitio antigénico Ø en su conformación unida a D25 debe conducir a títulos protectores mejorados (FIG. 30B).

Además de proporcionar una dirección para la mejora, la matriz de información también puede proporcionar una estimación de que puede producirse el grado de una mejora de este tipo. Es decir, una vez que se ha establecido una correlación, a saber, entre la estabilidad física o imitación estructural en las respuestas protectoras, se puede maximizar la estabilidad física (p. ej., a 100 % de retención de la unión de D25) o la imitación estructural (p. ej., a la imitación exacta de una conformación unida a D25) para obtener una idea de mejora máxima de la respuesta protectora inducida con relación a ese parámetro particular. Estos resultados (FIG. 30A, B) sugieren que la imitación estructural adicional probablemente no tendría mucho efecto en la inmunogenicidad, pero la estabilización física adicional del sitio antigénico Ø podría mejorar sustancialmente la calidad antigénica de los títulos protectores. Es probable que parámetros independientes, tales como adyuvante, multimerización o regímenes de inmunización permitan la mejora a la respuesta inducida, y parámetros de este tipo se pueden analizar y optimizar independientemente (la flexibilidad de un sitio antigénico puede incrementar su inmunogenicidad al permitir al sitio conformarse a un diversidad más amplia de anticuerpos. Los autores de la invención observan en este contexto que los factores de movilidad atómica del sitio antigénico Ø estaban entre los más altos en el ectodominio F de RSV).

Los parámetros experimentalmente mezclados también pueden proporcionar discernimiento. Por ejemplo, para determinar el enfoque de los sueros inducidos de F de RSV, la inmunogenicidad se puede interrogar antigénicamente (FIG. 30C). Para medir la antigenicidad de los sueros inducidos por diferentes formas de F de RSV, las diferentes formas de F de RSV se acoplaron a una punta de biosensor Octet, y se midió la reactividad de los sueros inducidos, así como los sueros "preabsorbidos", a los cuales se han añadido diferentes formas de F de RSV (FIG. 30C). Con DS-Cav1 en el sensor, las respuestas del biosensor a los macacos inmunizados con F, DS y DS-Cav1 de postfusión mostraron respuestas incrementadas (FIG. 30C, panel izquierdo); con F de postfusión en el sensor, las respuestas del biosensor a los mismos sueros mostró respuestas disminuidas (FIG. 30C, panel derecho); y con los sueros que se habían preabsorbido con F de postfusión y con DS-Cav1 en el sensor, las respuestas de los macacos inmunizados con F, DS y DS-Cav1 de postfusión tienen la tendencia con títulos inducidos de protección (FIG. 30C panel izquierdo). Globalmente, los títulos CE_{50} inducidos no tenían tendencia con las respuestas antigénicas medidas contra las formas ya sea de prefusión o de postfusión de F de RSV, pero se correlacionaron con el nivel de respuestas específicas de prefusión, ya sea medidas con una diferencia o como una relación ($p = 0.005$) entre las respuestas dirigidas de F de RSV de prefusión y postfusión (FIG. 30D) (para la forma "prefusión" de F de RSV, se utilizó la variante estabilizada en DS-Cav1 de F de RSV). Estos resultados sugieren que la calidad de la respuesta inmune es sustancialmente mejor para el inmunógeno F de RSV en la conformación de prefusión contra la posfusión, un descubrimiento que puede referirse a la potencia de neutralización superior observada para los anticuerpos específicos de prefusión que fijan como objetivo el sitio antigénico Ø (debe ser posible desconvolucionar la respuesta inducida, al utilizar sondas estructuralmente definidas, como se muestra con F de RSV unida a D25 y motavizumab en la FIG. 39).

Sin desear estar limitados por la teoría, los sitios antigénicos que contienen múltiples epítopos fijados como objetivo por los anticuerpos que se derivan de los múltiples genes de línea germinal pueden ser objetivos de vacuna ideales puesto que estos "supersitios" tienen una alta probabilidad de inducir múltiples linajes de anticuerpos neutralizantes. El sitio antigénico Ø en F de RSV es un ejemplo de un supersitio antigénico que también es un sitio de vulnerabilidad viral. Muchas de las lecciones aprendidas de los esfuerzos con el RSV descritos en la presente, tal como la importancia de examinar la respuesta inmune natural de seleccionar el sitio diana apropiado, son probables que sean generalmente aplicables. Globalmente, al enfocar el diseño basado en la estructura en los supersitios de vulnerabilidad, la vacunología estructural puede estar en la cima de lograr un desplazamiento alterante de paradigma en el desarrollo de vacunas contra patógenos virales.

Materiales y Métodos

Virus y células. Se prepararon extractos virales y se mantuvieron como se describe previamente (Graham et al., J. Med. Virol. 26, 153 (1988)). Se construyó la proteína fluorescente verde (GFP) que expresa RSV, RSV-GFP y se proporcionó como se informó previamente (Hallak et al., Virology 271, 264 (2000)). El título de los extractos de RSV-GFP utilizados para la neutralización basada en citometría de flujo y ensayos de fusión fue $2.5x10^7$ ufp/ml. El título del extracto A2 de RSV utilizado para el ensayo de fijación fue 1.02×10^8 ufp/ml. Las células HEp-2 se mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle que contiene suero bovino fetal al 10 % (EMEM al 10 %) y se complementaron con glutamina, penicilina y estreptomicina.

Expresión y purificación de anticuerpos y fragmentos Fab. Los anticuerpos se expresaron mediante la co-transfección transitoria de plásmidos de cadena pesada y ligera en células HEK293F en suspensión a 37 ºC

durante 4-5 días (véase arriba, y también McLellan et al., Nat Struct Mol Biol 17, 248 (2010); McLellan et al., J Virol 84, 12236 (2010)). Los sobrenadantes de células se hicieron pasar sobre agarosa de Proteína A, y los anticuerpos unidos se lavaron con PBS y se eluyeron con tampón de elución de IgG en 1/10º volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Los Fabs se crearon al digerir la IgG con Lys-C o proteasa HRV3C (McLellan et al., Nature 480, 336 (2011)), y las mezclas de Fab y Fc se hicieron pasar nuevamente sobre la agarosa de Proteína A para eliminar los fragmentos Fc. Los Fabs que fluyeron a través de la columna se purificaron, además, mediante la cromatografía de exclusión por tamaño.

Detección de construcciones F de RSV estabilizados en prefusión. Las variantes F de RSV de prefusión se derivaron de la construcción Fd F(+) de RSV (véase el Ejemplo 1), que consiste en los residuos 1-513 de F de RSV con un motivo de trimerización de fibritina T4 C-terminal (McLellan et al., Nature 480, 336 (2011)), el sitio de trombina, la etiqueta 6x His y StreptagII. Un enfoque de expresión de gen transitorio formateado en microplaca de 96 pocillos se utilizó para lograr la expresión de alto rendimiento de diversas proteínas F de RSV, como se describe previamente (Pancera et al., PLoS ONE 8, e55701 (2013)). Brevemente, 24 horas antes de la transfección, las células HEK 293T se sembraron en cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos a una densidad de $2.5x10^5$ células/ml en medio de expresión (DMEM de alto contenido en glucosa complementado con suero bovino fetal de IgG ultra-bajo al 10 % y 1x aminoácidos no esenciales), y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 20 h. El DNA de plásmido y TrueFect-Max (United BioSystems, MD) se mezclaron y se añadieron a las células en cultivo, y la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C, 5 % de CO_2. Un día post-transfección, el medio enriquecido (DMEM con alto contenido en glucosa más suero bovino fetal de IgG ultra-bajo al 25 %, 2x aminoácidos no esenciales, 1x glutamina) se añadió a cada uno de los pocillos y regresó a la incubadora para el cultivo continuo. El día cinco post-transfección, la proteína F de RSV expresada en el sobrenadante se recogió y se testó mediante ELISA para la unión a anticuerpos D25 y motavizumab utilizyo microplacas de Ni^{2+}-NTA. Después de la incubación de los sobrenadantes recogidos a 4 °C durante una semana, se repitieron los ELISAS.

Expresión y purificación a gran escala de construcciones de F de RSV. F de RSV de postfusión soluble se expresó y se purificó como se describe previamente (McLellan, J Virol 85, 7788 (2011)). Variantes de prefusión se expresaron mediante la transfección transitoria en células Expi293F utilizyo TrueFect-Max (United BioSystems, MD). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron 5 días post-transfección y se centrifugaron a 10.000 g para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes de cultivo se filtraron en condiciones estériles antes del intercambio de tampón y se concentraron utilizyo la filtración de flujo tangencial (van Reis, J Membrane Sci 159, 133 (1999)). Glicoproteínas F de RSV se purificaron mediante cromatografía de afinidad de níquel y StrepTactina inmovilizada, y las fracciones relevantes que contenían las variantes F de RSV se agruparon, se concentraron y se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño (véase el Ejemplo 1). Las etiquetas de afinidad se eliminaron mediante digestión con trombina, seguida por la cromatografía de exclusión por tamaño. Las glicoproteínas utilizadas en las inmunizaciones de primates no humanos se testaron en cuanto a endotoxinas utilizyo el ensayo de lisado de amebocitos de limulus y si es necesario, las proteínas se hicieron pasar sobre una columna Endotrap Red (BioVendor) para eliminar las endotoxinas antes de las inmunizaciones. El nivel de endotoxina fue < 5 UE/kg de peso corporal/hr, como se mide por el kit de prueba de lisado de amebocitos de Limulus cromogénico de punto final (LAL) (Lonza, Basilea, Suiza).

Caracterización antigénica de F de RSV estabilizado. Se utilizó un instrumento forteBio Octet Red384 para medir la cinética de unión de F de RSV a anticuerpos que fijan como objetivo el sitio antigénico Ø (D25, AM22), sitio I (131-2a), sitio II (pavlizumab, motavizumab) y sitio IV (101F). Todos los ensayos se realizaron con ajuste de agitación a 1.000 rpm en solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) con el fin de minimizar las interacciones no específicas. El volumen final para todas las soluciones fue 100 µl/pocillo. Los ensayos se realizaron a 30 °C en placas de 96 pocillos negras sólidas (Geiger Bio-One). *Strep*MAR-Immo (35 µg/ml) en tampón PBS se utilizó para cargar sondas Fc anti-ratón durante 300 s, que luego se utilizaron para capturar proteínas variantes F de RSV relevantes que contenían una etiqueta *Strep* C-terminal. Niveles de captura típicos para cada etapa de carga estaban entre 0.7 y 1 nm, y la variabilidad dentro de una fila de ocho puntas no excedió 0.1 nm para cada una de estas etapas. Las puntas de biosensores se equilibraron luego durante 300 s en PBS+BSA al 1 % antes de medir la asociación con los fragmentos de unión a antígeno (FAB) en solución (0.002 µM a 1 µM) durante 300 s; Fabs se dejaron luego disociar durante 400 s-1200 s, dependiendo de la velocidad de disociación observada. Los pocillos de disociación se utilizaron únicamente una vez para prevenir la contaminación. La corrección paralela para sustraer el desplazamiento de referencia sistemática se llevó a cabo al sustraer las mediciones registradas para un sensor cargado incubado en PBS + BSA al 1 %. Para eliminar las respuestas de unión no específicas, una molécula HIV-1 gp120 con una etiqueta *Strep* C-terminal se cargó en las sondas Fc anti-ratón y se incubó con Fab de RSV, y las respuestas no específicas se sustrajeron de los datos de respuesta variante de F de RSV. El análisis de datos y el ajuste de curva se llevaron a cabo utilizyo el software Octet, versión 7.0. Los datos experimentales se ajustaron con las ecuaciones de unión que describen una interacción 1:1. Se llevaron a cabo análisis globales de los conjuntos de datos completos asumiendo la unión reversible (disociación completa) utilizyo el ajuste de mínimos cuadrados no lineal que permite obtener un solo conjunto de parámetros de unión simultáneamente para todas las concentraciones utilizadas en cada uno de los experimentos.

Estabilidad física de variantes F de RSV. Para evaluar la estabilidad física de proteínas F de RSV diseñadas

bajo diversas condiciones de estrés, las proteínas se trataron con una diversidad de estreses farmacéuticamente relevantes, tales como pH extremo, alta temperatura, baja y alta osmolalidad, así como ciclos de congelación/descongelación repetidos. La estabilidad física de las proteínas F de RSV tratadas se evaluó por su grado de conservación del sitio antigénico Ø después del tratamiento, un parámetro crítico estimado por la unión del anticuerpo D25 específico del sitio Ø.

En el tratamiento de pH, la proteína F de RSV se diluyó a una concentración inicial de 50 µg/ml, ajustada a pH 3.5 y pH 10 con tampones apropiados, y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos antes ser neutralizada nuevamente a pH 7.5 y se ajustó a 40 µg/ml. En el tratamiento de temperatura, la proteína de RSV a razón de 40 µg/ml se incubó a 50 °C, 70 °C y 90 °C durante 60 minutos en cicladores de PCR con platinas calentadas para prevenir la evaporación. En el tratamiento de la osmolalidad, 100 µl de soluciones de proteína F de RSV (40 µg/ml) que contiene originalmente NaCl 350 mM se diluyeron con solución tampón Tris 2.5 mM (pH 7.5) a una osmolalidad de NaCl 10 mM o se ajustaron con MgCl2 4.5 M a una concentración final de 3.0 M. Las soluciones de proteína se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente y luego se llevaron nuevamente a NaCl 350 mM al añadir NaCl 5 M o la dilución con la solución tampón Tris 2.5 mM, respectivamente, antes de bajar la concentración a 100 pl. El tratamiento de congelación/descongelación se llevó a cabo 10 veces mediante la congelación y descongelación repetidas en nitrógeno líquido a 37 °C. La unión del anticuerpo D25 a las proteínas F de RSV tratadas se midió con un instrumento Octet con los protocolos arriba descritos. Los grados de estabilidad física se mostraron como la relación del nivel de unión a D25 de estado permanente antes y después del tratamiento con estrés.

Cristalización y recopilación de datos de rayos X de las proteínas F de RSV estabilizadas en prefusión. Cristales de RSV F DS, Cav1, DSCav1 y DSCav1TriC se cultivaron mediante el método de difusión de vapor en gotas colgantes a 20 °C al mezclar 1 µl de F de RSV con 1 µl de la solución de depósito (tartrato de K/Na 1.4 M, CHES 0.1 M pH 9.5, $LiSO_4$ 0.2 M). Los cristales se congelaron directamente en nitrógeno líquido. Los cristales de RSV F Cav1 y DSCav1 también se cultivaron mediante el método de difusión de vapor en gotas colgantes a 20 °C al mezclar 1 µl de F de RSV con 0.5 µl de solución de depósito (sulfato de amonio 1.7 M, citrato 0.1 M pH 5.5). Los cristales se transfirieron a una solución de sulfato de amonio 3.2 M, citrato 0.1 M pH 5.5, y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Todos los datos de difracción de rayos X se recopilaron en una longitud de onda de 1.00 Å en el haz de luz ID-22 de SER-CAT.

Determinación de la estructura, refinamiento y análisis de F de RSV estabilizada en prefusión

Los datos de difracción de rayos X se integraron y se escalaron con el conjunto HKL2000 (Otwinowski y Minor, en Methods Enzymol. (Academic Press, 1997), vol. 276, pp 307-326)), y las soluciones de reemplazo molecular se obtuvieron por PHASER (McCoy et al., Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40, 658 (2007)) utilizyo la estructura F de RSV unida a D25 (PDB ID: 4JHW, (véase el ejemplo 1)) como un modelo de búsqueda. La construcción del modelo manual se llevó a cabo utilizyo COOT (Emsley et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66, 486 (2010)), y el refinamiento se realizó en PHENIX (Adams et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66, 213 (2010)). La recopilación de datos final y la estadística de refinamiento se presentan en la FIG. 40. Las superposiciones de estructuras F de RSV se realizaron utilizyo los residuos 225-455 que mostraron altos niveles de similitud estructural. Los cálculos rmsd del sitio antigénico Ø se basaron en los residuos 61-71 y 194-219, que estuvieron dentro de 10 Å del anticuerpo D25 en la estructura compleja de F de RSV-D25.

Análisis de microscopía electrónica de tinción negativa. Las muestras se adsorbieron a rejillas de película de carbono descargadas en brillo recientemente, se enjuagaron dos veces con tampón y se tiñeron con formiato de uranilo al 0.75 % recientemente preparado. Las imágenes se registraron en un microscopio FEI T20 con una cámara CCD 2k x 2k Eagle a un tamaño de píxel de 1.5 Å. El análisis de las imágenes y el promedio 2D se realizó con Bsoft (Heymann, J. Struct Biol 157, 3 (2007)) y EMAN (Ludtke et. al., J. Struct. Biol. 128, 82 (1999)).

Inmunizaciones de NHP. Todos los experimentos con animales se revisaron y se aprobaron por el Animal Care y Use Committee of the Vaccine Researcha Centrar, NIAID, NIH, y todos los animales se alojaron y se cuidaron de acuerdo con las políticas locales, estatales, federales e institucionales en una instalación acreditada por la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) en el NIH. A animales *Macaca mulata* de origen indio que pesaban 8.76-14.68 kg se les inyectaron por vía intramuscular inmunógenos en la semana 0 y la semana 4. La sangre se recolectó cada dos semanas hasta durante 6 semanas.

Ensayos de neutralización de RSV. Los sueros se distribuyeron como diluciones cuádruples de 1:10 a 1:40960, se mezclaron con un volumen igual de genes F prototípicos que expresan mKate-RSV recombinante de la cepa A2 y la proteína fluorescente Katushka, y se incubaron a 37 °C durante una hora. A continuación, 50 µl de cada una de las mezclas de dilución de suero/virus se añadió a las células HEp-2 que habían sido sembradas a una densidad de $1.5x10^4$ en 30 µl en MEM (medio esencial mínimo) en cada uno de los pocillos de placas de fondo óptico negro de 384 pocillos, y se incubaron durante 20-22 horas antes del análisis espectrofotométrico a Ex 588 nm y Em 635 nm (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA 94089). La CI_{50} para cada una de las muestras se calculó mediante el ajuste de curva y la regresión no lineal utilizyo GraphPad Prism (Software GraphPad Inc., San Diego CA). Los valores p se determinaron mediante el test t de Student.

Análisis de antigenicidad de sueros. Se utilizó un instrumento fortéBio Octet Red384 para medir la reactividad de los sueros a las proteínas variantes F de RSV con agitación, temperatura, placas de 96 pocillos, tampón y volúmenes idénticos a los utilizados para las mediciones cinéticas. RSV F DSCav1 y F de postfusión se inmovilizaron a sondas de acoplamiento de aminas a través de la activación de sonda en una mezcla de activación EDC/NHS durante 300 s en acetato 10 mM pH 5. La reactividad de la sonda se extinguió utilizyo etanolamina 10 mM pH 8.5. Niveles de captura típicos estaban entre 0.7 y 1 nm, y la variabilidad dentro de una fila de ocho puntas no excedió de 0.1 nm para cada una de estas etapas. Las puntas de biosensor se equilibraron luego durante 300 s en tampón PBS+BSA al 1 % antes de las mediciones de unión. Los sueros se diluyeron a una dilución de 1/50 y 1/100 en PBS + BSA al 1 % y la unión se estimó durante 300 s. El agotamiento de los sueros se llevó a cabo al utilizar 1 µg de DSCav1 o proteína F de postfusión por cada 1 µl de sueros de animales. La corrección paralela para sustraer la unión de sueros no específica se llevó a cabo al sustraer los niveles de unión de una sonda no cargada incubada con los sueros. La antigenicidad específica del sitio se evaluó al incubar las sondas cargadas con la variante F de RSV con Fab de D25 1 o 2 µM para la evaluación del sitio Ø y motavizumab Fab para la evaluación del sitio II o ambos anticuerpos para evaluar la reactividad no del sitio Ø/II restante.

Ejemplo 10

Proteínas F de RSV de cadena sencilla estabilizadas en una conformación de prefusión

Este ejemplo ilustra proteínas F de RSV recombinantes adicionales que carecen de los sitios de escisión de furina nativos, de modo que el protómero de proteína F se forma como una sola cadena polipeptídica, en lugar de un heterodímero F_2/F_1. Los diagramas esquemáticos que ilustran el diseño de las proteínas F de RSV de cadena sencilla estabilizas en prefusión adicionales se proporcionan en las FIGs. 43 y 44.

Las FIGs. 43-45 ilustran el diseño de una serie de construcciones de cadena sencilla, que incluyen la construcción Nº 9 de F de RSV de cadena sencilla (scF nº 9; BZGJ9 DSCav1; SEQ ID NO. 669). Las variables para los construcciónes de cadena sencilla incluyen el tamaño de enlazador, los puntos finales de F1 y F2 y el mecanismo utilizado para inducir la trimerización de la construcción de cadena sencilla. Adicionalmente, se pueden emplear varias estrategias para estabilizar las construcciónes de cadena sencilla en una conformación de prefusión, incluyendo el uso de las estrategias descritas en la presente. Las construcciones de cadena sencilla indicadas se expresaron en células y se caracterizaron mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (FIG. 46) y la unión a los anticuerpos específicos de F de RSV (FIG. 47).

Para caracterizar adicionalmente la construcción nº 9 de F de RSV (scF nº 9; BZGJ9 DSCav1; SEQ ID NO.: 669), la estructura tridimensional de esta proteína se resolvió mediante la cristalografía de rayos X (véanse las FIGs. 48-51). Los cristales cúbicos se cultivaron utilizyo el método de difusión de vapor en una solución de depósito de Li_2SO_4 1.19 M, PEG 400 al 3,33 %, $MgSO_4$ 0.12 M, NaOAc 0.1 M pH 5.5. Los cristales se cultivaron hasta ~120 µm antes de que se congelaran instantáneamente en una solución de depósito que contenía sulfato de litio 2 M. Los datos de difracción se recopilaron a una resolución de 3.2 Å con una intensidad sobre el error de 2.84. La estructura del cristal ilustró la ubicación del enlazador GS en la construcción Nº 9 (FIGs. 49 y 50), se utilizó para predecir la ubicación de otros tamaños de enlazador (FIG. 51), y como base del diseño de construcciones de cadena sencilla adicionales BZGJ9-1 a 9-10 (véase la FIG. 55). Los genes optimizados en codones de la construcción de cadena sencilla con un motivo de trimerización de fibritina de T4 C-terminal, sitio de trombina, etiqueta 6x Hisg y StreptagII se sintetizaron y se subclonaron en un vector de expresión de mamífero derivado de pLEXm. Los plásmidos que expresan Fd F(+) de RSV se transfectaron en células HEK293 GnTI -/- en suspensión. Después de 4-5 días, el sobrenadante celular se recogió, se centrifugó, se filtró y se concentró. La proteína se purificó inicialmente a través de la resina Ni2+-NTA (Qiagen, Valencia, CA) utilizyo un tampón de elución que consiste en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 200 mM e imidazol 250 mM pH 8.0. El complejo se concentró después y, además, se purificó adicionalmente sobre resina StrepTactin según las instrucciones del fabricante (Novagen, Darmstadt, Alemania). Después de una incubación durante la noche con la proteasa trombina (Novagen) para eliminar las etiquetas His y Strep, un exceso de Fab de D25 se añadió al complejo, que luego se purificó en una columna de filtración en gel Superdex-200 (GE Healthcare) con un tampón de desarrollo de Tris-HCl 2 mM pH 7.5, NaCl 350 mM y NaN_3 al 0.02 % o solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4. Los productos de un solo gen de ferritina de cadena sencilla se expresaron y se purificaron de una manera similar.

Varias construcciones de cadena sencilla se seleccionaron para la prueba de inmunogenicidad en modelos con animales (FIG. 53). BZGJ9 DS-Cav1, BZGJ9, BZGJ11 DS-Cav1 (monómero), BZGJ10 (fracciones de monómero y trímero), BZGJ8 (monómero), BZGJ4 DS-Cav1 y BZGJ11 DS-Cav1-lumazina sintasa (oligómero 60mero) se testaron todas en cuanto a la inmunogenicidad en grupos de 10 ratones CB6F1/J al inyectar 10 ng de proteína en presencia de 50 ng de poli I:C en la semana 0 y la semana 3. Sueros de la semana 5 se testaron en cuanto a la inmunogenicidad. Los grupos de control de DS-Cav1 del subtipo A de F de RSV y la proteína de Postfusión también se testaron y se inmunizaron de una manera similar.

Para evaluar la neutralización contra el subtipo A y el subtipo B de RSV, los sueros de animales inmunizados se distribuyeron como diluciones cuádruples de 1:10 a 1:40960, se mezclaron con un volumen igual de genes F prototípicos que expresan mKate-RSV recombinante del subtipo A (cepa A2) o subtipo B (cepa 18537) y la proteína fluorescente Katushka y se incubaron a 37 ºC durante 1 h. A continuación, 50 µl de cada una de las mezclas de dilución de suero/virus se añadió a células HEp-2 que habían sido sembradas a una densidad de $1.5x10^4$ en 30 pl de MEM (medio esencial mínimo) en cada uno de los pocillos de placas de fondo óptico negro de 384 pocillos, y se incubaron durante 20-22 h antes del análisis espectrofotométrico a excitación de 588 nm y emisión de 635 nm (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, CA). La CI_{50} para cada muestra se calculó mediante el ajuste de curva y la regresión no lineal utilizyo GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., CA). Los valores P se determinaron mediante el test t de Student.

Los resultados de neutralización demuestran que todas las construcciones de cadena sencilla testadas son inmunogénicas.

Las construcciones de cadena sencilla se enlazaron a ferritina para producir nanopartículas de ferritina que incluyen los antígenos SCF (FIG. 56). Brevemente, el extremo C del polipéptido F1 incluido en la proteína scFv se enlazó a ferritina, y la proteína recombinante se expresó en células para producir nanopartículas de SCF-ferritina. Un ejemplo es la proteína "BZGJ9-DS-Cav1-Enlace Largo-Ferritina" (SEQ ID NO: 1429), que incluye una proteína de cadena sencilla de F de RSV recombinante que incluye un enlazador GS entre las posiciones 105 y 145 de F de RSV de una subunidad de ferritina enlazada a la posición 513 de la proteína F de RSV mediante un enlazador de péptido heterólogo generado al enlazar el extremo C del polipéptido F1 en scF nº 9 a una subunidad de ferritina. Las nanopartículas de scF-ferritina se expresaron, se purificaron, y se caracterizaron en cuanto a la estabilidad a la temperatura, pH y osmolaridad (FIG. 57). Adicionalmente, las nanopartículas de ferritina se administraron a los animales para demostrar que son inmunogénicas (FIG. 58). Las tres construcciones testadas fueron RSV F DSCav1 (SEQ ID NO: 371), BZGJ9-DS-Cavl-Enlace Largo-Ferritina (SEQ ID NO: 1429), y SCF nº 9 (también denominada BZGJ9 DS-Cav1, SEQ ID NO: 669). Éstas son de la misma inmunogenicidad/neutralización que la descrito anteriormente.

Varias secuencias de cadena sencilla se proporcionan en las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 19, así como una indicación del enfoque de diseño.

Tabla 19. Proteínas F de RSV de Cadena Sencilla Ejemplares

Nombre	Concepto	Anteceden-te		Mutaciones	SEQ ID NO
Foldon no escindible					
BZGJ9-1	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador G entre el residuo 105 a 145	698
BZGJ9-2	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GG entre el residuo 105 a 145	699
BZGJ9-3	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GQG entre el residuo 105 a 145	700
BZGJ9-4	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GGSG (Seq. 1443) entre el residuo 105 a 145	701
BZGJ9-5	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GGSG (Seq. 1443) entre el residuo 105 a 145	702
BZGJ9-6	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GGSG (Seq-_1443) entre el residuo 105 a 145	703
BZGJ9-7	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GGSGGS (Seq. 1444) entre el residuo 105 a 145	704

BZGJ9-8	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GGSGGSG (Seq_1445) entre el residuo 105 a 145	705
BZGJ9-9	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			Fusión del residuo 103 a 145	706
BZGJ9-10	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			enlazador GS entre el residuo 103 a 145	707
Foldon escindible					
scRSVF9aCCextxFd	Inter-DS	BZGJ9a (SeqID 669 sin DSCav1 mut.)	xFd	512CChnvnagkstt	708
scRSVF9aC485C494xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	485C.494C	709
scRSVF9aC519C520extxFd		BZGJ9a	xFd	512LLhnvnaCCstt	710
scRSVF9aC99C362xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	99C, 362C	711
scRSVF9aC99C361xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	99C, 361C	712
scRSVF9aC153C461xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	153C, 461C	713
scRSVF9aC102C359xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	102C, 359C	714
scRSV F 9axFd	xFd	BZGJ9a	xFd	512LLSAI	715
scRSV F 9aextxFd	xFd	BZGJ9a	xFd	512LLhnvnagkstt	716
Partículas de Ferritina – sin Foldon					
OpFerI	ES de F de RSV F	BZGJ9a	Fer	S190V	717
OpFer2	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	K226L	718
OpFer3	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	T58I, A298M	719
OpFer4	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V,K226L	720
OpFer5	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V,T58I, A298M	721
OpFer6	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	K226L,T58I, A298M	722
OpFer7	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	T58I,A298M,S190V,K226L	723
OpFer8	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	CavI	724
OpFer9	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	No mutaciones SC9a	725
OpFer10	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V con espiral enrollada optimizada--enlazador 8 aa	726
OpFerII	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V con espiral enrollada optimizada--enlazador 8 aa optimizada --enlazador 8aa	727
OpFer12	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V FIRKSDELLSAIGGYIPS APSGSG-Fer	728

OpFer13	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V SC-Foldon- 8aa-Fer	729
OpFer14	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fer	S190V conductor optimizado	730
Foldon no escindible					
OpFdI	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V	731
OpFd2	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	K226L	732
OpFd3	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	T58I, A298M	733
OpFd4	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V, K226L	734
OpFd5	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V, T58I, A298M	735
OpFd6	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	K226L, T58I, A298M	736
OpFd7	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	T58I, A298M, S190V, K226L	737
OpFd8	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190F, V207L	738
OpFd9	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	No mutacionesSC9a	739
OpFd10	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V con espiral enrollada optimizada	740
OpFdII	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V con CC y espiral enrollada optimizada	741
OpFd14	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V conductor optimizado	742
OpFd14	ES de F de RSV	BZGJ9a	Fd	S190V conductor optimizada	743
Foldon escindible					
scRSVF9a 74C218C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	74C, 218C	744
scRSVF9a 146C460C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	146C, 460C	745
scRSVF9a 149C458C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	xFd149C, 458C	746
scRSVF9a 374C454C xFd	Inter-DS	BZGJ9a	xFd	374C, 454C	747
scRSVF 74C218C xFd	Inter-DS	SEQ_669 (BZGJ9 DSCav1)	xFd	74C, 218C	748
scRSVF 146C460C xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	146C, 460C	749
scRSVF 149C458C xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	149C, 458C	750
scRSVF 374C454C xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	374C, 454C	751
scRSVF9 C485C494xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav	xFd	485C, 494C	752
scRSVF9 C519C520extxFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	519C, 520C	753
scRSVF9 C99C362xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	99C, 362C	754
scRSVF9 C99C361xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	d99C, 361C	755

scRSVF9 C153C461xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	153C, 461C	756
scRSVF9 C102C359xFd	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	xFd	102C, 359C	757
Foldon no escindible					
BZGJ9pi I217W	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I217W	758
BZGJ9pi I221W	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I221W	759
BZGJ9pi D486F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	H486F	760
BZGJ9pi T400F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	T400F	761
BZGJ9pi V278F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	V278F	762
BZGJ9pi Q224D,L78K	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	Q224D, L78K	763
BZGJ9pi I217W, I221W		BZGJ9 DSCav1	Fd	I217W, I221W	764
BZGJ9pi I217W, I221W, L78F	Inter-DS	BZGJ9 DSCav1	Fd	I217W, I221W, L78F	765
GSJscINT_1	SC RSV F	DSCAV1	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	766
GSJscINT_2	SC RSV F	DSCAV2	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	767
GSJscINT_3	SC RSV F	DSCAV3	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	768
GSJscINT_2 F488W	SC RSV F	DSCAV4	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	769
GSJscINT_1 Q354A	SC RSV F	DSCAV5	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	770
GSJscINT_MBE	SC RSV F	DSCAV6	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	771
GSJscINT_2 F488Wsh	SC RSV F	DSCAV7	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	772
GSJscINT_1 F488Wsh	SC RSV F	DSCAV8	Fd	F2 enlazado al péptido de fusión completo mediante el enlazador (Gly)n	773
BZGJ9-11	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GS entre 102 y 145	774
BZGJ9-12	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GS entre 101 y 145	775
BZGJ9-13	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GS entre 100 y 145	776
BZGJ9-14	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GS entre 99 y 145	777
BZGJ9-15	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GS entre 98 y 145	778
BZGJ9-16	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GS entre 97 y 145	779
BZGJ9-17	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GGSG entre 103 y 145	780
BZGJ9-18	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GGSGG entre 103 y 145	781
BZGJ9-19	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GGSGGSG entre 103 y 145	782

BZGJ9-20	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador GGSGN entre 103 y 145	783
BZGJ9-21	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador N entre 102 y 145	784
BZGJ9-22	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador ISSTSATGS entre 96 y 145	785
BZGJ9-23	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador VTSTSATGS entre 96 y 145	786
BZGJ9-24	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador NSALSATGS entre 96 y 145	787
BZGJ9-25	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador ISSTTSTGS entre 96 a 145	788
BZGJ9-26	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador VTSTTSTGS entre 96 y 145	789
BZGJ9-27	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador NSALSSTGS entre 96 y 145	790
BZGJ9-28	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador ISSTSATVGGS entre 96 y 145	791
BZGJ9-29	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador VTSTSATTGGS entre 96 y 145	792
BZGJ9-30	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador NSALSATGGS entre 96 y 145	793
BZGJ9-31	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador LISSTTSTVGGS entre 96 y 145	794
BZGJ9-32	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador VTSTTSTTGGS entre 96 y 145	795
BZGJ9-33	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL		Fd	enlazador NSALSSTGGS entre 96 y 145	796
Partículas de Lumazina Sintasa					
BZGJ10-DSCav1-LS	Monómero RSV F SC en LS		LS	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	797
BZGJ10-DSCavl1DEF-LS	Monómero RSV F SC en LS		LS	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	798
BZGJ11-DSCav1-LS	Monómero RSV F SC en LS		LS	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	799
BZGJ11-DSCav1-SS-LS	Monómero RSV F SC en LS		LS	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	800
Foldon no escindible, con Pep27					
A2-PP1	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	801
B18537-PP1	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	802
A2-DS-Cav1-PP1	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	803
B18537 DS-Cav1-PP1	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	804

A2-DS-Cav1-PP1-dFold	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	805
B18537 DS-Cav1-PP1-dFold	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	806
A2-DS-Cav1-PP1-GCN4	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	807
B18537 DS-Cav1-PP1-GCN4	SC sin sitios de furina para mantener pep27		Fd	Sitio I de furina SEKS y sitio II de furina SEKSGS	808
BZGJ9-dscav1 N155Q	SC BZGJ9-DS-Cav1 conIL		Fd	Eliminación del sitio de glicano introducido en BZGJ9-DSCav1 (SEQ ID:669 ubicado en la región de enlazador en Asn 105	809
BZGJ9-DS-Cav1- FerritinHis	Añadir Histidinas a Ferr para mejorar la expresión y purificación		Fd	Introducción de seis residuos His a la molécula de Ferritina para permitir la purificación de moléculas F de RSV en el contexto de Ferritina sin utilizar secuencias de etiqueta His o etiqueta Strep.	810
Construcciones adicionales					
B18537-BZGJ9-9	cepa B18537		Fd	Subtipo B de F de RSV de cadena sencilla (cepa B18537) con fusión directa del residuo 103 a 145	811
B18537-BZGJ9-10	cepa B18537		Fd	Subtipo B de F de RSV de cadena sencilla (cepa B18537) con enlazador GS entre el residuo 103 y 145	812
B1-BZGJ9-9	cepa B1		Fd	Subtipo B de F de RSV de cadena sencilla (cepa B1) con fusión directa del residuo 103 a 145	813
B1-BZGJ9-10	cepa B1		Fd	Subtipo B de F de RSV de cadena sencilla (cepa B) con enlazador GS entre el residuo 103 y 145	814
BZGJ9ext-9			xFd	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (BZGJ9 nº 669) con fusión directa del residuo 103 a 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de las etiquetas de Trombina-His Strep.	815
BZGJ9ext-10			xFd	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (BZGJ9 nº 669) con el enlazador GS entre el residuo 103 a 145 y un alargamiento del C-terminal que añade los residuos hnvnagkstt después de L513 y antes de las etiquetas Trombina-HisStrep.	816

B18537-BZGJ9ext-9	cepa B18537		xFd	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B18537) con fusión directa del residuo 103 a 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de las etiquetas Trombina-HisStrep.	817
B18537-BZGJ9ext-10	cepa B18537		xFd	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B18537) con el enlazador GS entre el residuo 103 y 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos Hnvnagkstt después de L513 y delante de las etiquetas Trombina-His-Strep	818
B1-BZGJ9ext-9	cepa B1		xFd	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B1) con fusión directa del residuo 103 a 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de las etiquetas Trombina-His-Strep.	819
B1-BZGJ9ext-10	cepa B1		xFd	DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B1) con enlazador GS entre el residuo 103 y 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de las etiquetas Trombina-His-Strep.	820
BZGJ9extxFd-9				DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (BZGJ9 nº 669) con fusión directa del residuo 103 a 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de Foldon escindible y las etiquetas Trombina-His-Strep.	821
BZGJ9extxFd-10				DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (BZGJ9 nº 669) con enlazador GS entre el residuo 103 y 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante del Foldon escindible y las etiquetas Trombina-His-Strep.	822

B18537-BZGJ9extxFd-9				DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B18537) con fusión directa del residuo 103 a 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante del Foldon escindible y las etiquetas Trombina-His-Strep.	823
B18537-BZGJ9extxFd- 10	cepa B18537			DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B18537) con el enlazador GS entre el residuo 103 y 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de Foldon escindible y las etiquetas Trombina-His-Strep.	824
B1-BZGJ9extxFd-9	cepa B1			DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B1) con fusión directa del residuo 103 a 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo los residuos hnvnagkstt después de L513 y delante del Foldon escindible y las etiquetas Trombina-His-Strep.	825
B1-BZGJ9extxFd-10	cepa B1			DS-Cav1 de F de RSV de cadena sencilla (subtipo B (cepa B1) con enlazador GS entre el residuo 103 y 145 y un alargamiento del extremo C añadiendo residuos hnvnagkstt después de L513 y delante de las etiquetas Trombina-His-Strep.	826
BZGJ9-CS1				F de RSV de cadena sencilla con el enlazador MTSVLHRFDTDAF entre 96 y 150	1474
BZGJ9-CS2				F de RSV de cadena sencilla con el enlazador MTSVLWFGDTDAFA entre 96 y 150	1475
BZGJ9-10-GSJCCcola5xFd			xFd	F de RSV de cadena sencilla basado en la secuencia nº 707 con la secuencia C-terminal CChnvnagksttnGGLVP RGS que codifica los enlaces disulfuro y el fondon escindible	1476

BZGJ9-10-GSJCCcola6xFd			xFd	F de RSV de cadena sencilla basado en la secuencia nº 707 con la secuencia C-terminal LLhnvnaCCsttnGGLVP RGS que codifica los enlaces disulfuro y el foldon escindible	1477
BZGJ9-10-GSJCCcola9xFd			xFd	F de RSV de cadena sencilla basado en la secuencia nº 707 con la secuencia C-terminal CChnvnaCCsttnGGLVP RGS que codifica los enlaces disulfuro y el foldon escindible	1478
BZGJ9-9-DS-Cav1-Ferritina				BZGJ9-9 de cadena sencilla de F de RSV (nº 706) con fusión del residuo 103 a 145 en el contexto de Ferritina	827
BZGJ9-10-DS-Cav1-Ferritina				BZGJ9-10 de cadena sencilla de F de RSV (nº 707) enlazador GS entre el residuo 103 y 145	828
BZGJ9-DS-Cav1-Enlace Largo-Ferritina				BZGJ9 de cadena sencilla de F de RSV (nº 669) en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de F de RSV al extremo N de Ferritina	1429
BZGJ9-9-DS-Cav1-Enlace Largo-Ferritina				BZGJ9 de cadena sencilla de F de RSV (nº 706) con fusión del residuo 103 a 145 en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de RSV al extremo N de Ferritina	1430
BZGJ9-10-DS-Cav1-Enlace Largo-Ferritina				BZGJ9-10 de cadena sencilla de F de RSV (nº 707) con enlazador GS entre el residuo 103 y 145 en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de RSV al extremo N de Ferritina	1431

BZGJ9-DS-Cav1-EnlaceLargo-FerritinaHis	Añadir Histidinas a Ferr para mejorar la expresión y purificación			BZGJ9 de cadena sencilla de F de RSV (nº 669) en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de F de RSV al extremo N de Ferritina con histidinas añadidas a la molécula de Ferritina para facilitar la purificación de nanopartículas de Ferritina sin el uso de etiquetas His o Strep.	1432
BZGJ9-iG1	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			Enlazador ARLLGSGSG desde 96 a 147	1433
BZGJ9-iG2	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			Enlazador ARLLGGSG desde 96 a 147	1434
BZGJ9-iG3	SC BZGJ9-DS-Cav1 con/IL			Enlazador ARLLGGSG desde 96 a 148	1435
BZGJ9-iG4	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			Enlazador LARLLGSG desde 96 a 147	1436
BZGJ9-iG5	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			Enlazador mcistGGSG desde 96 a 147	1437
BZGJ9-iG6	SC BZGJ9-DS-Cav1 con IL			Enlazador agstGGSG desde 96 a 147	1438
B18537-BZGJ9-9-Enlace Largo-Ferritina	cepa B18537			BZGJ9-9 de cadena sencilla de F de RSV (nº 811) con fusión del residuo 103 a 145 en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de RSV al extremo N de Ferritina	1439
B18537-BZGJ9-10-Enlace Largo-Ferritina	cepa B18537			BZGJ9-10 de cadena sencilla de F de RSV (nº 812) con GS enlazador entre el residuo 103 y 145 en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de RSV al extremo N de Ferritina	1440
B1-BZGJ9-9-EnlaceLargo-Ferritina	cepa B1			BZGJ9-9 de cadena sencilla de F de RSV (nº 813) con fusión del residuo 103 a 145 en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de RSV al extremo N de Ferritina	1441
B1-BZGJ9-10-EnlaceLargo-Ferritina	cepa B1			BZGJ9-10 de cadena sencilla de F de RSV (nº 814) entre el residuo 103 y 145 en el contexto de Ferritina con un enlazador largo desde el extremo C de RSV al extremo N de Ferritina	1442

El rendimiento de proteína se calculó para varias de las proteínas F recombinantes, y se muestra a continuación en la Tabla 27.

Tabla 27. Rendimiento de la expresión de proteína F de RSV recombinante

Nombre de la Construcción	Rendimiento (mg/L)	SEQ ID NO
scRSVF9aCCextxFd	12.7	708
scRSVF9aC485C494xFd	4.1	709
scRSVF9aC419C420extxFd	11.4	710
scRSVF9aC99C362xFd	2.2	711
scRSV F 9axFd	15.7	715
scRSV F 9aextxFd	29.6	716
GSJsclNT_1	0.84	766
GSJsclNT_3	0.9	768

Ejemplo 11

La estructura de una proteína F de RSV de la cepa B18537 con las mutaciones de DSCav1

Este ejemplo ilustra la similitud de la proteína RSV con las sustituciones de DSCav1 estabilizantes a través de los subtipos de RSV. Las sustituciones de DSCav1 se introdujeron en la proteína F de RSV de la cepa B18537. Y la estructura tridimensional de la proteína recombinante resultante, que incluye un dominio Foldon C-terminal, se resolvió utilizyo métodos similares a los descritos anteriormente. Como se muestra en las FIGs. 59-62, las sustituciones de DSCav1 podrían ser introducidas con éxito en un subtipo B de glicoproteína F de RSV para estabilizar el sitio antigénico Ø para generar un mutante de DSCav1 en el antecedente del subtipo B que específicamente se une a anticuerpos específicos de prefusión. La Tabla 25, que figura a continuación, proporciona un resumen de los datos cristalográficos para DSCav1 en el subtipo B de F de RSV.

Tabla 25. Datos cristalográficos concernientes al subtipo B de DSCav1

	RSV B18537 F
código de acceso de PDB	
Recopilación de datos	
Grupo espacial	$P4_132$
Constantes de celda	
a, b, c (A)	167.9, 167.9, 167.9
a, b, g (°)	90, 90, 90
Longitud de onda (Å)	1.00
Resolución (Å)	50.0-1.94 (2.01-1.94)
$R_{combinación}$	10 (78.8)
I / sI 11.96	(1.12)
Completitud (%)	95.9 (79.7)
Redundancia	4.0 (2.4)
Refinamiento	
Resolución (Å)	1.94
Reflexiones únicas	57.616
$R_{trabajo}$ /R_{libre} (%)	18.71/21.52
Nº de átomos	
Proteína	3552
Ligyo/ion	5
Agua	401
Factores *B* ($Å^2$)	
Proteína	46.2
Ligyo/ion	78,3
Agua	53.2
Desviaciones R.m.s.	
Longitudes de enlace (Å)	0.009
Ángulos de enlace (°)	1.17
Ramachyran	

Regiones favorecidas (%)	96.18
Regiones permitidas (%)	3.82
Regiones desfavorecidas (%)	0

Ejemplo 12

Diseño y producción de proteínas F de RSV recombinantes sin un dominio de trimerización.

Este ejemplo ilustra el diseño y la producción de proteínas F de RSV recombinantes que se estabilizan en una conformación de prefusión pero que no incluyen un dominio de trimerización C-terminal para mantener la estabilidad del lóbulo proximal a la membrana de la proteína F de RSV.

Brevemente, en lugar del dominio de trimerización C-terminal, un anillo de enlaces disulfuro se introduce en el extremo C del polipéptido F1 al sustituir los residuos cisteína con los aminoácidos de hélice α10. Las tres hélices α10 de ectodominio F de RSV para una espiral-espiral que estabilizó la porción proximal a la membrana de la proteína. Cuyo se expresa en células, los enlaces disulfuro de inter-protómero se forman entre las cisteínas introducidas en la hélice α10, "bloqueyo" con ello las tres hélices α10 en estrecha proximidad y evityo el movimiento del dominio proximal a la membrana de la conformación de pre- a la conformación de post-fusión. La hélice α10 de la proteína F de RSV incluye los residuos 492 al dominio de transmembrana (residuo 529).

En este ejemplo, la proteína F de RSV recombinante con el anillo de cisteína estabilizante se expresa inicialmente como una proteína recombinante que incluye un dominio de trimerización. El dominio de trimerización se puede eliminar proteolíticamente después de la expresión inicial. La escisión se puede realizar antes, después o durante la purificación de la proteína F de RSV. Actualmente los autores de la invención purifican la proteína F de RSV utilizyo Tendem NI2+ IMAC y las etapas de inmovilización de Streptactin a través de la etiqueta His6 y StrepII C-terminal, seguido por la digestión de trombina a temperatura ambiente durante 12 horas y luego la separación del foldon de la proteína F de RSV mediante la cromatografía de exclusión por tamaño. Sería posible también purificar la proteína F de RSV escindida mediante el intercambio iónico.

Las FIGs. 63-68 muestran resultados de filtración en gel y la tinción con azul de Coomassie del análisis PAGE reducido y no reducido de varias de las proteínas F recombinantes sin dominio de trimerización como el diseño enumerado más adelante. La Tabla 22 proporciona características antigénicas y físicas de las construcciones indicadas, que incluyen las sustituciones DSCav1 y las sustituciones de cisteína en la hélice α10 en las posiciones 525 y 526 (CCCola4xFd), 512 y 513 (CCCola5xFd), 519 y 520 (CCCola6xFd), y 512 y 512 (CCLargoxFd). La SEQ ID NO correspondiente para cada una de las construcciones se muestra en la FIG. 66.

Tabla 22. Características antigénicas y físicas de variantes de glicoproteína F de RSV modificadas por ingeniería genética

	Caracterización física (reactividad de D25 fraccionaria)						
	incubación de 1 hora Temp (°)		**pH**		**Osmolalidad (mM)**		**10 veces congelación-descongelación**
Construcción	**50**	**70**	**3.5**	**10**	**10**	**3000**	
GSJ CCcola 4x Fd no escindido	0.9	0.5	0.9	0.9	1.0	0.8	0.3
GSJ CC cola 4x Fd escindido	0.9	0.4	0.9	1.0	1.0	0.7	0.4
GSJ CC cola 5x Fd no escindido	0.9	0.6	0.9	1.0	1.0	0.7	0.2
GSJ CC cola 5x Fd escindido	0.9	0.2	0.9	1.0	1.0	1.0	0.2
GSJ CCcola 6x Fd no escindido	0.9	0.4	0.9	0.9	1.0	0.7	0.2
GSJ CC cola6 xFd escindido	1.0	0.3	0.9	0.9	1.0	0.7	0.3

GSJ CC cola Larga xFd no escindido	0.9	0.1	0.7	0.8	0.8	0.6	0.1
GSJ CC cola Larga xFd escindido	1.0	0.3	0.9	1.0	1.0	0.8	0.2

Varias secuencias de proteína F de RSV sin dominios de trimerización, o con un dominio de trimerización escindible se proporcionan en las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 23, así como una indicación del enfoque de diseño. Se indican el nombre, anillo de cisteína α10, la presencia o ausencia del Foldon C-terminal o Foldon escindible, la secuencia antecedente (p. ej., "DSCAV1" indica que la construcción incluye las sustituciones de DSCav1), el concepto de diseño y SEQ ID NO correspondiente. En la Tabla 23, se utilizan los siguientes acrónimos: DSCAV1: sustituciones S155C, S290C, S190F, V207L; Op-Espiral en espiral optimizada; OpCC – Espiral en espiral optimizada con disulfuros; InterC - disulfuro de Interprotómero en la hélice C-terminal; Multi-InterC - Estabilización de disulfuro interprotómero múltiple; ECC: Estabilidad de espiral-espiral potenciaada; FP-CC: puente de Cys de péptido de fusión; 190P: aminoácido alternativo del bolsillo 190; Fd (Foldon no escindible), xFd (foldon escindible), N (no Foldon); CFM: mutación de relleno de cavidad; ICFM: mutaciones de relleno de cavidad Interfacial.

Las proteínas F de RSV recombinantes con o sin un dominio de trimerización escindible enumerado en la Tabla 23 se expresaron en células bajo condiciones en las que las proteínas son secretadas de las células en el medio celular como se describe arriba en el Ejemplo 9. Cada una de las construcciones contiene una secuencia conductora que provoca que la proteína penetre en el sistema secretorio y sea secretada. El medio se centrifugó después y el sobrenadante se utilizó para testar la antigenicidad para la unión al anticuerpo D25 específico del sitio Ø y el anticuerpo específico del sitio II Motavizumab ("Mota", FIGs. 69A-69E). Las condiciones testadas incluyen la unión de D25 y Mota el día 0 (condiciones 1 y 2), la unión de D25 y Mota el día 0 después de incubación a 70 ºC durante una hora (condiciones 3 y 4), y la unión de D25 y Mota después de 1 semana a 4 ºC (condiciones 5 y 6). El control es la construcción de DSCav1 con un dominio foldon. Los datos de antigenicidad específicos para cada una de las construcciones se proporcionan en las FIGs. 69A-69e (las condiciones testadas se observan en las filas de encabezamiento).

Tabla 23. Proteínas de F de RSV recombinantes que carecen de un dominio de trimerización, o que tienen un dominio de trimerización segmentable de proteasa.

Nombre de Construcción	Motivo	C-Term	Antecedente	Concepto de diseño	SEQ ID NO
CS/GSJ ext2OptiI	512LLhnvnagLstVnimLttVI	N	DSCAV1	Op	829
CS/GSJ ext2Opti2	512LLhnvnagLstVnKmLttVI	N	DSCAV1	Op	830
CS/GSJ ext2Opti3	512LLhnvnKkLstVnKmLnVI	N	DSCAV1	Op	831
CS/GSJ ext20pCC1	512CChnvnagLstVnKmLttVI	N	DSCAV1	OpCC	832
CS/GSJ ext2OpCC2	512LLhnvnaCCstVnKmLttVI	N	DSCAV1	OpCC	833
CS/GSJ ext2OpCC3	512LLhnvnagLstVnKCCttVI	N	DSCAV1	OpCC	834
CS/GSJ ext2OpCC4	512FQNAVESTINTLQTTLEA V AQAI	N	DSCAV1	Op	835
CS/GSJ GCN4ccI	512IEDKIEEILSKQYHIENEIA RCC	N	DSCAV1	OpCC	836
CS/GSJ GCN4cc2	512CCDKIEEILSKQYHIENEI A RIK	N	DSCAV1	OpCC	837
CS/GSJ CartOp	512LLhnvnagLstVnKmLttVIK	N	DSCAV1	OpCC	838
GSJ CClargoxFd	512CCHNVNAGKSGG	xFd	DSCAV1	InterC	839
GSJ CCextremoIxFd	512CChnvnagksttnimitt	xFd	DSCAV1	InterC	840
GSJ CCextremo2xFd	512LLhnvnaCCsttnimitt	xFd	DSCAV1	InterC	841
GSJ CCextremo3xFd	512LLhnvnagksttniCCtt	xFd	DSCAV1	InterC	842
GSJ CCextremo4xFd	512LLhnvnagksttnCCitt	xFd	DSCAV1	InterC	843
GSJ CCextremoSxFd	512CChnvnagksttn	xFd	DSCAV1	InterC	844
GSJ CCextremo6xFd	512LLhnvnaCCsttn	xFd	DSCAV1	InterC	845
GSJ CCextremo7xFd	512LLhnvnagksttn	xFd	DSCAV1	Hélice C-terminal extendida	846
GSJ CCextremoIxFd	512LLhnvnagksttnimitt	xFd	DSCAV1	Hélice C-terminal extendida	847

GSJ CCextremo9.1xFd	512CChnvnaCCsttnimitt	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	848
GSJ CCextremo9xfd	512CChnvnaCCsttn	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	849
GSJ CCextremolOxFd	485C494C 512Cchnvnagksttn	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	850
GSJ CCextremol1xEd	485C494C 512CchnvnaCCsttn	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	851
Tail11 s_ds_F505W_oxFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaCCsttn	xFd	SeqID 566 (Basado en DSCav1)	Multi-InterC	852
GSJ CCextremol2xFd	512CChnvnaCCsttniCCtt	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	853
GSJ CCextremol3xFd	485C494C 512CchnvnaCCsttniCCtt	xFd	DSCAV1	Multi-InterC	854
GSJ CCextremol4xFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaCCsttniCCtt	xFd	SeqID 566 (Basado en DSCav1)	Multi-InterC	855
GSJ CCextremol5xEd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaCCsttn	xFd	SeqID 566 (Basado en DSCav1)	Multi-InterC	856
GSJ CCextremol6xFd	SeqID 566 + 485C494C 512CchnvnaGKsttniCCtt	xFd	SeqID 566 (Basado en DSCav1)	Multi-InterC	857
GSJT11	DSCav1-S509W, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	858
GSJT12	DSCav1-S509F, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	859
GSJT13	DSCav1- L512F, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	860
GSJT14	DSCav1-S509W, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	861
GSJT15	DSCav1-S509F, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	862
GSJT16	DSCav1-S509W, L512F, L513C, 514E, 515C	N	DSCAV1	ECC	863
GSJT17	DSCav1- L512F, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	864
GSJT18	DSCav1-S509W, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	865
GSJT19	DSCav1-S509F, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	866
GSJT20	DSCav1-S509W, L512F, L513C, 514E, 515E, 516C	N	DSCAV1	ECC	867
GSJT21	DSCav1- L512C, L513E, 514C	N	DSCAV1	ECC	868
GSJT22	DSCav1- L512C, L513E, 514E, 516C	N	DSCAV1	ECC	869
GSJT23	DSCav1- A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	870
GSJT24	DSCav1- L512T, L513E	N	DSCAV1	ECC	871
GSJT25	DSCav1- L512T, L513E, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	872
GSJT26	DSCav1- L512S, L513E	N	DSCAV1	ECC	873
GSJT27	DSCav1- L512S, L513E, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	874
GSJT28	DSCav1- L512S, L513D	N	DSCAV1	ECC	875
GSJT29	DSCav1- L512S, L513D, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	876

GSJT30	DSCav1- L512F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	877
GSJT31	DSCav1- L513F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	878
GSJT32	DSCav1- L512F, L513F, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	879
GSJT33	DSCav1- L512Y, L513Y, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	880
GSJT34	DSCav1- L512F, L513Y, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	881
GSJT35	DSCav1- L512W, L513W, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	882
GSJT36	DSCav1- L5132W, L513Y, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	883
GSJT37	DSCav1-S509W, A515C, I516C	N	DSCAV1	ECC	884
GSJT38	DSCav1-S509F, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	885
GSJT39	DSCav1-S509W, L512F, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	886
GSJT40	DSCav1-S509W, L512F, L513F, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	887
GSJT41	DSCav1-S509F, L512A, L513A, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	888
GSJT42	DSCav1-S509W, L512A, L513A, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	889
GSJT43	DSCav1- F505W, 1506W, 5509F, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	890
GSJT44	DSCav1- F505W, 1506W, S509F, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	891
GSJT45	DSCav1- F505W, 1506W, S509F, L512S, L513E, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	892
GSJT46	DSCav1- F505W, 1506W, S509F, L512A, L513A, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	893
GSJT47	DSCav1- F505K, 1506D, S509F, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	894
GSJT48	DSCav1- F505K, 1506D, S509F, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	895
GSJT49	DSCav1- F505K, I506D, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	896
GSJT50	DSCav1- F505K, 1506D, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	897
GSJT51	DSCav1- F505K, 1506D, L512A, L513A, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	898
GSJT52	DSCav1- F505K, 1506D, L512S, L513E, L512C, L513C	N	DSCAV1	ECC	899
GSJT53	DSCav1- F505K, 1506D, L512S, L513D, A515C, 1516C	N	DSCAV1	ECC	900
GSJ-FP1	DSCav1-F137C, R339C	Fd	DSCAV1	FP-CC	969
GSJ-FP2	DSCav1- F137C, T337C	Fd	DSCAV1	FP-CC	970
GSJ-FP3	DSCav1-G139C, Q354C	Fd	DSCAV1	FP-CC	971
GSJ-FP4	F137C, R339C	Fd	DSCAV1	FP-CC	972
GSJ-FP5	F137C, T337C	Fd	DSCAV1	FP-CC	973
GSJ-FP6	G139C, Q354C	Fd	DSCAV1	FP-CC	974

GSJ-190P1	L260F	Fd	DSCAV1	190P	975
GSJ-190P2	L260W	Fd	DSCAV1	190P	976
GSJ-190P3	L260Y	Fd	DSCAV1	190P	977
GSJ-190P4	L260R	Fd	DSCAV1	190P	978
GSJ-190P5	L188F	Fd	DSCAV1	190P	979
GSJ-190P6	L188W	Fd	DSCAV1	190P	980
GSJ-190P7	L188Y	Fd	DSCAV1	190P	981
GSJ-190P8	L188R	Fd	DSCAV1	190P	982
GSJ-190P9	157F	Fd	DSCAV1	190P	983
GSJ-190P10	157W	Fd	DSCAV1	190P	984
GSJ-190P11	157R	Fd	DSCAV1	190P	985
GSJ-190P12	L252F	Fd	DSCAV1	190P	986
GSJ-190P13	L252W	Fd	DSCAV1	190P	987
GSJ-190P14	L252R	Fd	DSCAV1	190P	988
GSJ-190P15	V192F	Fd	DSCAV1	190P	989
GSJ-190P16	V192W	Fd	DSCAV1	190P	990
GSJ-190P17	V192R	Fd	DSCAV1	190P	991
GSJ-DS1	5150C, Y458C	Fd	DSCAV1	Estabilización de Disulfuros	992
GSJ-D52	A149C, N460C	Fd	DSCAV1	Estabilización de Disulfuros	993
GSJ-D53	S146C, N460C	Fd	DSCAV1	Estabilización de Disulfuros	994
GSJ-D54	A149C, Y458C	Fd	DSCAV1	Estabilización de Disulfuros	995
GJ-3-1	V220F	Fd	DSCAV1	CFM	996
GJ-3-2	V220W	Fd	DSCAV1	CFM	997
GJ-3-3	V220M	Fd	DSCAV1	CFM	998
GJ-3-4	T219F	Fd	DSCAV1	CFM	999
GJ-3-5	T219M	Fd	DSCAV1	CFM	1000
GJ-3-6	T219W	Fd	DSCAV1	CFM	1001
GJ-3-7	T219R	Fd	DSCAV1	CFM	1002
GSJ-Int-FdF-1	I221F	Fd	DSCAV1	ICFM	1003
GSJ-Int-FdF-2	I221Y	Fd	DSCAV1	ICFM	1004
GSJ-Int-FdF-3	I221W	Fd	DSCAV1	ICFM	1005
GSJ-Int-FdF-4	Q224D, L78K	Fd	DSCAV1	ICFM	1006
GSJ-Int-FdF-5	V278F	Fd	DSCAV1	ICFM	1007
GSJ-Int-FdF-6	Q279F	Fd	DSCAV1	ICFM	1008
GSJ-Int-FdF-7	N277D, S99K	Fd	DSCAV1	ICFM	1009
GSJ-Int-FdF-8	Q361F	Fd	DSCAV1	ICFM	1010
GSJ-Int-FdF-9	V402F	Fd	DSCAV1	ICFM	1011
GSJ-Int-FdF-10	T400F	Fd	DSCAV1	ICFM	1012
GSJ-Int-FdF-11	T400W	Fd	DSCAV1	ICFM	1013
GSJ-Int-FdF-12	H486F	Fd	DSCAV1	ICFM	1014
GSJ-Int-FdF-13	H486W	Fd	DSCAV1	ICFM	1015
GSJ-Int-FdF-14	1217F	Fd	DSCAV1	ICFM	1016
GSJ-Int-FdF-15	I217Y	Fd	DSCAV1	ICFM	1017
GSJ-Int-FdF-16	1217W	Fd	DSCAV1	ICFM	1018
DSCavlOpFdl	F190V	Fd	DSCAV1	Estabilidad potenciada de DSCav1	1019
DSCav1OpFd2	K226L	Fd	DSCAV1	Estabilidad potenciada de DSCav1	1020
DSCav1OpFd3	1581, A298M	Fd	DSCAV1	Estabilidad aumentada de DSCav1	1021
DSCav1OpFd4	F190V, K226L	Fd	DSCAV1	Estabilidad aumentada de DSCav1	1022

DSCav1OpFd5	F190V, 1581, A298M	Fd	DSCAV1	Estabilidad potenciada de DSCav1	1023
DSCav1OpFd6	K226L, 1581, A298M	Fd	DSCAV1	Estabilidad potenciada de DSCav1	1024
DSCav1OpFd7	1581, A298M, F190V, K226L	Fd	DSCAV1	Estabilidad potenciada de DSCav1	1025
CSGSJ1		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modificada con motivos internos GCN4	1456
CSGSJ2		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modificada con motivos internos GCN4	1457
CSGSJ3		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modifcada con motivos internos GCN4	1458
CSGSJ4		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modificada con motivos internos GCN4	1459
CSGSJ5		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modificada con motivos internos GCN4	1460
CSGSJ6		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modificada con motivos internos GCN4	1461
CSGSJ7		xFd	DSCAV1	Espiral en espiral alfa 10 modificada con motivos internos GCN4	1462
BZGJ9-10- TMCC1		xFd	DSCAV1	F de cadena sencilla, disulfuro alfa 10, sitio de Furina, Foldon, región TM	1463
BZGJ9-10-TMCC2		xFd	DSCAV1	F de cadena sencilla, disulfuro alfa 10, sitio de Furina, Foldon, región TM	1464
GSJCCTai19- TMCC1		xFd	DSCAV1	F, disulfuro alfa 10, sitio de Furina, Foldon, región TM	1465

GSJCCTai19- TMCC2		xFd	DSCAV1	F, disulfuro alfa 10, sitio de Furina, Foldon, región TM	1466
GSJCCTai19- TMCC3		xFd	DSCAV1	F, disulfuro alfa 10, sitio de Furina, Foldon, región TM	1467
GSJCCTai19- TMCC4		xFd	DSCAV1	F, disulfuro alfa 10, sitio de Furina, Foldon, región TM	1468

El rendimiento de proteína se calculó para varias de las proteínas F recombinantes, y se muestra seguidamente en la Tabla 26.

Tabla 26. Rendimiento de la expresión de proteína F de RSV recombinante

Nombre de diseño	Rendimiento mg/L	SEQ ID NO
CS/GSJ ext20pCC1	0.39	832
CS/GSJ ext2OpCC2	0.33	833
CS/GSJ ext2OpCC3	0.72	834
CS/GSJ ext2OpCC4	0.48	835
CS/GSJ GCN4cc1	2.85	836
CS/GSJ GCN4cc2	0.75	837
CS/GSJ CartOp	0.36	838
GSJ CClargoxFd	6,3	839
GSJ CCextremolxFd	1.05	840
GSJ CCextremo2xFd	0.33	841
GSJ CCextremo3xFd	0.99	842
GSJ CCextremo4xFd	1.53	843
GSJ CCextremo5xFd	2.13	844
GSJ CCextremo6xFd	1.65	845
CSGSJ7	0.66	1462
GSJ 1Cav1 13	8	913
JCB GSJ 4	8	942
JCB GSJ 5	8	943

Ejemplo 13

Mutaciones adicionales para estabilizar la porción distal a la membrana del Ectodominio F de RSV

Este ejemplo ilustra mutaciones adicionales que se hicieron a F de RSV para estabilizar la proteína en su conformación de prefusión.

Se diseñaron varias secuencias de proteína F de RSV sin dominios de trimerización y se proporcionan en las SEQ ID NOs enumeradas en la Tabla 24, así como una indicación del enfoque de diseño. Se indican el nombre, la mutación relativa a SEQ ID NO: 1026, la presencia o ausencia del dominio Foldon C-terminal, la secuencia de fondo (p. ej., "WT" indica F de RSV de tipo salvaje) el concepto de diseño y la SEQ ID NO correspondiente.

Las proteínas F de RSV recombinantes con un dominio de trimerización C-terminal enumeradas en la Tabla 24 se expresaron en células bajo condiciones en las que las proteínas se secretan de las células en el medio celular. Cada una de las construcciones contiene una secuencia conductora que provoca que la proteína penetre en el sistema secretor y sea excretada como se describe anteriormente en el Ejemplo 9. Luego se centrifugó el medio y el sobrenadante se utilizó para la prueba de antigenicidad para la unión al anticuerpo D25 específico del Sitio Ø y el anticuerpo específico del Sitio II Motavizumab ("Mota", FIGs. 69A-69E). Las condiciones testadas incluyen la unión de D25 y Mota el día 0 (condiciones 1 y 2), la unión de D25 y Mota el día 0 después de la incubación a 70 °C durante una hora (condiciones 3 y 4) y la unión de D25 y Mota después de 1 semana a 4 °C (condiciones 5 y 6). El control es la construcción DSCav1 con un dominio foldon. Los datos de antigenicidad específica para cada una de las construcciones se proporcionan en las FIGs. 69A-69E (las condiciones testadas se anotan en las filas de encabezado).

Tabla 24. Nueva estabilización con el dominio Foldon

Nombre de la Construcción	Mutación(es) con relación a SEQ ID NO: 1026	C-Term	Fondo	Concepto de diseño	SEQ ID NO
GSJ 1Cav1 1	S190W	Fd	WT	S190 AA Scan	901
GSJ 1Cav1 2	S190L	Fd	WT	S190 AA Scan	902
GSJ 1Cav1 3	S190R	Fd	WT	S190 AA Scan	903
GSJ 1Cav1 4	S190E	Fd	WT	S190 AA Scan	904
GSJ 1Cav1 5	S190A	Fd	WT	S190 AA Scan	905
GSJ 1Cav1 6	S190Q	Fd	WT	S190 AA Scan	906
GSJ 1Cav1 7	S190Y	Fd	WT	S190 AA Scan	907
GSJ 1Cav1 8	S190G	Fd	WT	S190 AA Scan	908
GSJ 1Cav1 9	S190P	Fd	WT	S190 AA Scan	909
GSJ 1Cav1 10	S190I	Fd	WT	S190 AA Scan	910
GSJ 1Cav1 11	S190T	Fd	WT	S190 AA Scan	911
GSJ 1Cav1 12	S190C	Fd	WT	S190 AA Scan	912
GSJ 1Cav1 13	S190V	Fd	WT	S190 AA Scan	913
GSJ 1Cav1 14	S190D	Fd	WT	S190 AA Scan	914
GSJ 1Cav1 15	S190N	Fd	WT	S190 AA Scan	915
GSJ 1Cav1 16	S190H	Fd	WT	S190 AA Scan	916
GSJ 1Cav1 17	S190K	Fd	WT	S190 AA Scan	917
GSJ 1Cav1 18	DS V207L	Fd	WT	S190 AA Scan	918
GSJ 1Cav1 19	DS S190F	Fd	WT	S190 AA Scan	919
GSJ 1Cav1 20	V207G	Fd	WT	S190 AA Scan	920
GSJ 1Cav1 21	V207A	Fd	WT	S190 AA Scan	921
GSJ 1Cav1 22	V207S	Fd	WT	S190 AA Scan	922
GSJ 1Cav1 23	V207T	Fd	WT	S190 AA Scan	923
GSJ 1Cav1 24	V207C	Fd	WT	S190 AA Scan	924
GSJ 1Cav1 25	V207L	Fd	WT	S190 AA Scan	925
GSJ 1Cav1 26	V207I	Fd	WT	S190 AA Scan	926
GSJ 1Cav1 27	V207M	Fd	WT	S190 AA Scan	927
GSJ 1Cav1 28	V207P	Fd	WT	S190 AA Scan	928
GSJ 1Cav1 29	V207F	Fd	WT	S190 AA Scan	929
GSJ 1Cav1 30	V207Y	Fd	WT	S190 AA Scan	930
GSJ 1Cav1 31	V207W	Fd	WT	S190 AA Scan	931
GSJ 1Cav1 32	V207D	Fd	WT	S190 AA Scan	932
GSJ 1Cav1 33	V207E	Fd	WT	S190 AA Scan	933
GSJ 1Cav1 34	V207N	Fd	WT	S190 AA Scan	934
GSJ 1Cav1 35	V207Q	Fd	WT	S190 AA Scan	935
GSJ 1Cav1 36	V207H	Fd	WT	S190 AA Scan	936
GSJ 1Cav1 37	V207K	Fd	WT	S190 AA Scan	937
GSJ 1Cav1 38	V207R	Fd	WT	S190 AA Scan	938
JCB GSJ 1	Y198F	Fd	WT	Probing JCB 16/18/24 residues	939

JCB GSJ 2	T219L	Fd	WT	Probing JCB 16/18/24 residues	940
JCB GSJ 3	V296I	Fd	WT	Probing JCB 16/18/24 residues	941
JCB GSJ 4	K226M	Fd	WT	Probing JCB 16/18/24 residues	942
JCB GSJ 5	K226L	Fd	WT	Probing JCB 16/18/24 residues	943
IG1-V192M	V192M	Fd	WT		944
IG2-A298M_RSVF(+)FdTHS-paH	A298M	Fd	WT		945
IG2-T58I_A298M	T58I_A298M	Fd	WT		946
IG2-T58I_V192F_A298I_RSVF(+)FdTHS-paH	T58I, V192F, A298I	Fd	WT		947
IG2-T58I_V192M_A298I_RSVF(+)FdTHS-paH	T58I, V192M, A298I	Fd	WT		948
i167m-a298m	I167M, A298M	Fd	WT		949
i167m-l181m	I167M, L181M	Fd	WT		950
i199f	I199F	Fd	WT		951
i57c-s190c	I57C, S190C	Fd	WT		952
ig2-t581-a298m	T58L, A298M	Fd	WT		953
ig2-t58m	T58M	Fd	WT		954
ig2-t58m-a298i	T58M, A298I	Fd	WT		955
ig2-t58m-a298L	T58M, A298L	Fd	WT		956
ig2-v192c-ins192-193-g-e256c	V192C, G insertion 192/193, E256C	Fd	WT		957
rsv f ths_s_f505w_o_s509f	ths_s_F505W_o_S509F	N	WT		958
rsv f ths_s_f505w_s509f	ths_s_F505W_S509F	N	WT		959
t58i-a298i	T58I, A298I	Fd	WT		960
t58m-a298m	T58M, A298M	Fd	WT		961
v179l-t189f	V179L, T189F	Fd	WT		962
v192f	V192F	Fd	WT		963
v192f-l252a	V192F, L252A	Fd	WT		964
v56m-i167m-l181m	V56M, I167M, L181M	Fd	WT		965
v56m-i167m-v296m	V56M, I167M, V296M	Fd	WT		966
v56m-l181f	V56M, L181F	Fd	WT		967
w52c-s150c	W52C, S150C	Fd	WT		968

Ejemplo 14

Inmunógenos del Sitio Mínimo Ø

El epítopo del sitio **Ø** de F de RSV se ubica en el ápice del pico del trímero e incluye la región reconocida por los tres anticuerpos neutralizantes D25, AM22 y 5C4. Más específicamente, como se esboza por la estructura cristalina del complejo F de RSV/D25, este epítopo comprende la superficie exterior de la hélice α4 (residuos 196-210) y el bucle adyacente (residuos 63-68) entre β2 y α1. Este ejemplo ilustra el diseño y la caracterización de antígenos que presentan el sitio Ø solo con residuos contiguos mínimos, y que se puede utilizar para inducir una respuesta inmune del sitio **Ø** y puede ser más económico de producir que el trímero F de RSV estabilizado en pre-fusión de longitud completa.

Conceptos generales para el diseño de inmunógenos F de RSV de sitio mínimo Ø

Los inmunógenos de sitio mínimo **Ø** se diseñaron utilizyo cuatro conceptos de diseño primario: permutación circular, permutación circular con armazón, inmunógenos del dominio III y multimerización.

Las permutaciones circulares implican la alteración de las conexiones nativas dentro de una estructura de proteína al tiempo que mantienen la orientación(es) espacial(es) de las partes componentes. Los componentes α4 del epítopo del sitio mínimo **Ø** y el bucle β2-α1 son cada uno parte de dos segmentos de bucle separados dentro de F1 de RSV. Para crear pliegues del sitio Ø estables, los dos segmentos de bucle se conectaron (C-terminal a N-terminal) con enlazadores de aminoácidos flexibles cortos en los dos diferentes órdenes posibles, para de esta manera crear dos pliegues separados, cada uno de los cuales preserva el epítopo del sitio **Ø** (FIG. 70A).

Para crear permutaciones circulares con armazón, los enlazadores flexibles cortos de las proteínas del sitio Ø circularmente permutadas se reemplazaron por segmentos rígidos pequeños de otras proteínas que proporcionan potencialmente una mayor estabilidad que los enlazadores de aminoácido simples (FIG. 70B).

El dominio III (residuos 50-306) es un dominio más grye de aproximadamente 250 aminoácidos de la proteína F de RSV que contiene el epítopo del sitio Ø (véase la FIG. 70D). Los residuos del dominio III que circundan el sitio Ø proporcionan la estabilidad estructural adicional al sitio Ø al tiempo que no añaden epítopos de superficie distractores adicionales significativos al inmunógeno. El dominio III contiene un sitio de escisión de furina natural entre los residuos 136 y 137 que expone el péptido de fusión. El dominio III se puede estabilizar, además, al reemplazar el sitio de escisión por un enlazador de aminoácido o al realizar una permutación circular para enlazar los extremos N y C originales o el dominio III y crear nuevos extremos N y C en el sitio de escisión. Ambos de estos métodos se utilizaron para estabilizar diversos inmunógenos de dominio III.

Por último, los inmunógenos del sitio Ø se multimerizaron para potenciar la inmunogenicidad (FIG. 70D y 70E). La trimerización se utilizó para imitar el trímero nativo observado en el pico viral de F de RSV de pre-fusión y los oligómeros definidos más gryes tales como 24meros y 60meros se utilizaron para potenciar específicamente la inmunogenicidad. Esto se realizó al introducir enlaces disulfuro entre las construcciones, o al enlazar covalentemente las construcciones conjuntamente como dímeros o trímeros utilizyo enlazadores de aminoácidos o al enlazar construcciones a los dominios de multimerización utilizyo enlazadores de aminoácido. Algunas construcciones utilizaron una combinación de estas estrategias. Los dominios de multimerización más pequeños utilizados fueron trímeros (p. ej., GCN4) y los más gryes fueron 60meros (p. ej., lumazina sintasa). Los inventores también utilizaron pentámeros, 12meros y 24meros.

Además de los conceptos de diseño principales arriba esbozados, los inmunógenos se estabilizaron al utilizar varios de otros métodos que incluyen la adición de enlaces disulfuro, mutaciones de relleno de cavidad, reducción de la hidrofobicidad de superficie, adición de residuos de superficie cargada y adición de glicanos N-enlazados y truncamiento de regiones potencialmente flexibles. Un listado de varios inmunógenos de sitio mínimo Ø se proporciona en las Tablas 20 (inmunógenos no de partícula de sitio Ø) y 21 (inmunógenos de sitio Ø en una nanopartícula de proteína) así como una indicación del enfoque de diseño. Se indican el nombre, el concepto, los residuos de proteína F de RSV, la estructura u otra proteína añadida y la SEQ ID NO correspondiente. En las Tablas 20 y 21, se utilizan los siguientes acrónimos: SØ: Sitio mínimo Ø; CP: permutación circular; DS: Disulfuro; CAV: relleno de cavidad; Carga: Adición de residuos cargados; SC: cadena sencilla; TD3: dominio del dominio III en tándem; D3: dominio III; RH: Reducción de Hidrofobicidad; Fd: dominio de trimerización Fd de T4; CCMPTD: dominio de trimerización de proteína de matriz de cartílago de pollo; MTQ-CC: motivo de trimerización de espiral enrollada de MTQ; CXVIII: dominio de trimerización del Colágeno XVIII; 2M0E: armazón del dedo de zinc 6 Miz-1 (2M0E); ATCasa: dominio de trimerización de aspartato carbamoiltransferasa (ATCasa) (1GQ3); GCN4: dominio de trimerización de GCN4; Fer: Ferritina; Dps: Microbacterium arborescens Dps; LS: Lumazina Sintasa de A. aeolicus; Thr: trombina; EH: hidrobófico expuesto; HCP1: hcp1 de P. aeruginosa (ly12).

Los inmunógenos del sitio mínimo Ø se expresaron en células utilizyo un sistema que resulta en la secreción de los inmunógenos del sitio mínimo Ø en el medio de cultivo de tejido como se describe arriba en el Ejemplo 9. Luego se centrifugó el medio y el sobrenadante se utilizó para la prueba de antigenicidad para la unión a los anticuerpos D25, AN22 y 5C4 específicos del Sitio Ø mediante ELISA (FIGs. 72A-72F). Las condiciones testadas incluyen la unión de D25 después de 0 y 1 semana a 4 °C (condiciones 1 y 2), la unión de D25 después de 1 h a 60 °C (condición 3), a 70 °C (condición 4), a 80 °C (condición 5), a 90 °C (condición 6) o a 100 °C (condición 7), la unión de AM22 después de dos semanas a 4 °C (condición 8), la unión de 5C4 en la semana 0 a 4 °C (condición 9). También se muestra el promedio de la unión de D25, AM22 y D25 después de 1 hora a 70 °C (condición 10). Un resumen de los datos de antigenicidad se proporciona en la FIG. 71, que muestra el número de inmunógenos del sitio mínimo Ø que caen dentro de cada una de las categorías de diseño y que produjeron un resultado de ELISA de por lo menos 1.5. Los datos de antigenicidad específica para cada una de las construcciones se proporcionan en las FIGs. 72A-72F (las condiciones testadas se anotan en las filas de encabezado). Los resultados indican que los inmunógenos del sitio mínimo Ø se unen específicamente a los anticuerpos específicos de prefusión; y, por lo tanto, son útiles para inducir una respuesta inmune en un sujeto al sitio antigénico Ø. Adicionalmente, los resultados indican que las construcciones del sitio mínimo Ø se pueden utilizar como sondas para aislar y detectar anticuerpos específicos de prefusión de F de RSV de una muestra.

En base a los datos de antigenicidad, se seleccionaron 14 de las construcciones iniciales como representativos para la evaluación en modelos de animales para producir una respuesta inmune, y para la caracterización física y estructural adicional. La métrica para elegir las 14 construcciones de selección incluidas muestran el promedio de ELISAs para D25 (semana 1), AM22 (semana 2) y D25 después de 1 hora a 70 grados. Para prevenir que varias construcciones muy similares sean elegidas para cada categoría, cada una de las categorías se subdividieron en categorías adicionales (SEQ ID NO entre paréntesis):

Categoría 1: Monómeros:

permutación circular del sitio Ø : TZ-13 (354567-108) Promedio: 3.18 (SEQ ID NO: 1040)

permutación circular del sitio Ø con armazón: JG_2KN0 (354567-417) Promedio: 3.00 (SEQ ID NO: 1053)

dominio III: E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS (354567-273) Promedio: 3.17 (SEQ ID NO: 1156)

dímero del dominio III: GSJnh4-TWIN (354567-693) Promedio: 3.06 (SEQ ID NO: 1194)

Categoría 2: Trímeros:

permutaciones circulares del sitio Ø : TZ-19 (354567-126) Promedio: 3.08 (SEQ ID NO: 1106)

dominio III (dos están enlazados): RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon (354567-210) Promedio: 3.08 (SEQ ID NO: 1170) y MS_08 (354567-447) Promedio: 3.08 (SEQ ID NO: 1188)

dímero del dominio III: GSJnh4Fd-TWIN (354567-705) Promedio: 3.01 (SEQ ID NO: 1212)

Categoría 3: Monómeros polivalentes:

permutación circular del sitio Ø en Ferritina: 2m0e-resurf1-Ferritin (354567-621) Promedio: 2.81 (SEQ ID NO: 1276)

dominio III en ferritina: GSJnh2F (354567-471) Promedio: 3.10 (SEQ ID NO: 1220)

monómero en un oligómero no de ferritina: LSL-E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS (354567-315) Promedio: 2.72 (SEQ ID NO: 1281)

Adicional: MP11 (354567-642) Promedio: 3.05 (SEQ ID NO: 1263)

Categoría 4: Trímeros multivalentes:

dominio III en nanopartículas (2): GSJnh2Fd-F (354567-483) Promedio: 2.57 (SEQ ID NO: 1266) y GSJnh4Fd-F (354567-489) Promedio: 2.02 (SEQ ID NO: 1268)

Tabla 20. Inmunógenos del sitio mínimo Ø (no en una nanopartícula de proteína)

Nombre	Concepto	Región de RSVF (residuo nºs)	Armazón u otra proteína añadida	SEQ ID NO
Permutación circular del sitio Ø (26)				
JCB_01	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	Enlazador APGG (Seq_1454)	1027
JCB_02	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	Enlazador APGG (Seq_1454), DS	1028
JCB_03	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	Enlazador APGG(Seq_1454), DS	1029
JCB_04	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	Enlazador AGSG(Seq_1455)	1030
JCB_05	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	Enlazador AGSG (Seq_1455), DS	1031
JCB_06	CP-SØ+CAV	60-94, 192-232	Enlazador AGSG (Seq_1455), DS	1032
JCB_07	CP-SØ+CAV	60-94, 192-229	Enlazador GSG	1033
JCB_08	CP-SØ+CAV	60-94, 192-229	Enlazador GSG, DS	1034
JCB_09	CP-SØ+CAV	60-94, 192-229	Enlazador GSG, DS	1035
TZ-09	CP-SØ+DS+CAV+ glicano	192-242, 60-97	Enlazador GGSGSGG (Seq_1446)	1036
TZ-10	CP-SØ+DS+CAV+carga	192-242, 60-97	Enlazador GGSGSGG(Seq_1446)	1037
TZ-11	CP más corto-SØ+DS+CAV+carga	192-242, 60-97	Enlazador GGSGSGG(Seq_1446)	1038
TZ-12	CP-SØ+DS+CAV+carga	192-242, 60-97	Enlazador GGSGSGG(Seq_1446)	1039
TZ-13	CP-SØ+DS+CAV+ glicano	192-242, 60-97	Enlazador GGSGSGG(Seq_1446)	1040

TZ-14	CP-SØ+DS+CAV+ glicano	192-242, 60-97	Enlazador GGSGSGG(Seq_1446)	1041
RSVF(+)THS_m e	CP-SØ	62-69-ggsggggsggsg(Seq_1447) - 196-212	Enlazador Ggsggggsggsg (Seq_1447)	1042
RSVF(+)THS_m e_hpl	CP-SØ	62-69 - ggsggggsggsg(Seq_1447) - 196-212	Enlazador ggsggggsggsg (Seq_1447)	1043
RSVF(+)THS_m e_ds	CP-SØ	62-69 – ggsggggsggsg (Seq_1447) - 196-212	Enlazador ggsggggsggsg (Seq_1447)	1044
RSVF(+)THS_m e_hpl_ds	CP-SØ	62-69 - ggsggggsggsg(Seq_1447) - 196-212	Enlazador ggsggggsggsg (Seq_1447)	1045
JG_circl	CP-SØ	60-94, 193-237	Enlazador GGSGG (Seq_1448)	1046
JG_circl_ds	CP-SØ+DS	60-94, 193-237	Enlazador GGSGG(Seq_1448)	1047
JG_circl_del K	CP-SØ+deleción	60-94, 193-237	Enlazador GGSGG(Seq_1448)	1048
JG_circl_sol ds	CP-SØ+DS	60-94, 193-237	Enlazador GGSGG(Seq_1448)	1049
JG_circl_sol	cp-SØ	60-94, 193-237	Enlazador GGSGG(Seq_1448)	1050
JG_Circ2	CP-SØ	60-75, 193-218	Enlazador GGSGG(Seg_1448)	1051
JG_Circ2_sol	cp-SØ	60-75, 193-218	Enlazador GGSGG(Seg_1448)	1052
Permutación circular con conexión de armazón (19)				
JG_2KNO	CP-SØ+sección del armazón TENC160-75, (2KNO)	193-218	Enlazador GGSGGSG(Seq_1445) y la armazón TENC1 (2KNO)	1053
Site_0_2a90_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+sección del armazón 2A90	61-96, 192-235	fragmento de dominio WWE (2A90)	1054
Site_0_2a90_2_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 2A90	61-96, 192-235	fragmento de dominio WWE (2A90)	1055
Site_0_2a90_3_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 2A90	61-96, 192-235	fragmento de dominio WWE (2A90)	1056
Site_0_2w59_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+sección del armazón 2W59	60-96, 193-238	fragmento IgY (2W59)	1057
Site_0_2w59_2_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón W59	60-96, 193-238	fragmento IgY (2W59)	1058
Site_0_2w59_3_GYC	CP-SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón	60-96, 193-238	fragmento IgY (2W59)	1059
Site_0_3u2e_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+sección del armazón 3U2E	61-96, 192-238	fragmento de dominio EAL (3U2E)	1060
Site_0_3u2e_2_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 3U2E	61-96, 192-238	fragmento de dominio EAL (3U2E)	1061
Site_0_3u2e_3_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 3U2E	61-96, 192-238	fragmento de dominio EAL (3U2E)	1062
Site_0_2vjl_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+sección del armazón 2VJ1	61-96, 192-240	fragmento de proteinasa SARS (2VJ1)	1063
Site_0_2vjl_2_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 2VJ1	61-96, 192-240	fragmento de proteinasa SARS (2VJ1)	1064
Site_0_2vjl_3_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 2VJ1	61-96, 192-240	fragmento de proteinasa SARS (2VJ1)	1065
Site_0_lchd_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+sección del armazón 1CHD	60-95, 192-240	fragmento de metilesterasa CheB (1CHD)	1066
Site_0_lchd_2_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 1CHD	60-95, 192-240	fragmento de metilesterasa CheB (1CHD)	1067
Site_0_lchd_3_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 1CHD	60-95, 192-240	fragmento de metilesterasa CheB (1CHD)	1068
Site_0_1pgz_1_GYC	CP-SØ+CAV+RH+sección del armazón 1PQZ	60-96, 192-239	Fragmento M144 de proteína inmunomoduladora (1PQZ)	1069
Site_0_1pgz_2_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 1PQZ	60-96, 192-239	Fragmento M144 de proteína inmunomoduladora (1PQZ)	1070

Site_0_1pgz_3_GYC	CP- SØ+CAV+RH+DS+sección del armazón 1PQZ	60-96, 192-239	Fragmento M144 de proteína inmunomoduladora (1PQZ)	1071
Permutación circular del sitio Ø con el trímero (39)				
JCB_10	CP-SØ+CAV+GCN4	60-94, 192-232	enlazador APGG, GCN4	1072
JCB_11	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	enlazador APGG, GCN4	1073
JCB_12	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	enlazador APGG, GCN4	1074
JCB_13	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	enlazador APGG, GCN4	1075
JCB_14	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	enlazador APGG, GCN4	1076
JCB_15	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-232	enlazador APGG, GCN4	1077
JCB_16	CP-SØ+CAV+GCN4	60-94, 192-229	enlazador GSG, GCN4	1078
JCB_17	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	enlazador GSG, DS,GCN4	1079
JCB_18	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	enlazador GSG, DS,GCN4	1080
JCB_19	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	enlazador GSG, GCN4	1081
JCB_20	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	enlazador GSG, DS,GCN4	1082
JCB_21	CP-SØ+CAV+DS+GCN4	60-94, 192-229	enlazador GSG, DS,GCN4	1083
TZ-01	CP-SØ+DS de intercadena	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1084
TZ-02	CP-SØ+DS de intercadena +CAV	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1085
TZ-03	CP-SØ+DS de intercadena +CAV	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1086
TZ-04	CP-SØ+DS de intercadena +CAV	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1087
TZ-05	CP-SØ+DS de intercadena+CAV+carga	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1088
TZ-06	CP-SØ+DS de intercadena +CAV+carga	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1099
TZ-07	CP-SØ+DS de intercadena+CAV+glicano	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1100
TZ-08	CP-SØ+DS de intercadena +CAV+glicano	192-242, 60-97	enlazador GGSGSGG(Seg_1446)	1101
TZ-15	CP-SØ+DS+CXVIII	58-97, 192-242	enlazador GGSGSGSG(Seq_1449) CXVIII	1102
TZ-16	CP-SØ+DS+CAV+CXVIII	58-97, 192-242	enlazador GGSGSGSG (Seq_1449), CXVIII	1103
TZ-17	CP-SØ+DS+CAV+CXVIII	58-97, 192-242	enlazador GGSGSGSG (Seq_1449), CXVIII	1104
TZ-18	CP-SØ+DS+CAV+CXVIII	58-97, 192-242	enlazador GGSGSGSG (Seq_1449), CXVIII	1105
TZ-19	CP-SØ+DS+CAV+carga+glicano+ CXVIII	58-97, 192-242	enlazador GGSGSGSG(Seq_1449), CXVIII	1106
TZ-20	CP-SØ+DS+CAV+carga+glicano+ CXVIII	58-97, 192-242	enlazador GGSGSGSG(Seq_1449),CXVIII	1107
A0_1	sc CP-SØ trímeros	60-97, 194-239	enlazadores de glicina múltiple	1108
A0_2	sc CP-SØ trímeros	60-97, 194-239	enlazadores de glicina múltiple	1109
A0_3	sc CP-SØ trímeros	60-97, 194-239	enlazadores de glicina múltiple	1110
A0_4	sc CP-SØ trímeros	60-97, 194-239	enlazadores de glicina múltiple	1111
A0_5	sc CP-SØ trímeros	60-97, 194-239	enlazadores de glicina múltiple	1112
A0_6	sc CP-SØ trímeros	60-97, 194-239	enlazadores de glicina múltiple	1113
A0_7	CP-SØ+N-terminal Fd	60-97, 194-239	Enlazadores de glicina y Fd	1114
A0_8	CP-SØ+C-terminal Fd	60-97, 194-239	Enlazadores de glicina y Fd	1115
A0_9	CP-SØ+C-terminal ATCasa	60-97, 194-239	Dominio de trimerización de ATCasa de E coli	1116
MP5	CP-SØ+Fd	56-97 GG -	enlazador GG y Fd	1117

		189-211		
MP6	CP-SØ+Fd	56-97 G 189- 211	enlazador GG y Fd	1118
MP7	CP-SØ+dominio GCN4ización	56-97 GG 189- 211	enlazador GG y dominio GCN4ización	1119
MP8	CP-SØ+ C-terminal ATCasa	56-97 G- ATCAsa-189-211	ATCasa	1120
Epítopo mínimo del sitio Ø en un armazón (6)				
2m0e-resurfl	SØ mínimo en 2MOE		2MOE	1121
2m0e-resurf2	SØ mínimo en 2MOE		2MOE	1122
2m0e-resurf3	SØ mínimo en 2MOE		2MOE	1123
2M0E_r04	SØ mínimo en 2MOE	196-212	2MOE	1124
2M0E_r05	SØ mínimo en 2MOE	196-212	2MOE	1125
2M0E_r06	SØ mínimo en 2MOE	196-212	2MOE	1126
Dominio III (42)				
RBD51-307 llmut DS-Cav1	D3+DS+RH	51-307		1127
RBD51-307 llmut DS- Cav1 2sug	D3+DS+RH, añadir glicanos	51-307		1128
RBD51-304 llmut DS- Cav1 3sug	D3+DS+RH, añadir glicanos	51-304		1129
RBD51-307 0mut DS- Cav1	D3+reducción de hidrofobicidad	51-307		1130
RBD51-307 10mut DS- Cav1 2sug	D3+RH, añadir glicanos	51-307		1131
RBD51-304 10mut DS- Cav1 3sug	D3+RH, añadir glicanos	51-304		1132
CP RBD51-307 llmut DS-Cav1	CP-D3+DS, RH	51-307		1133
CP RBD51-307 llmut DS-Cav1 2sug	CP-D3+DS, RH	51-307		1134
CP RBD51-304 llmut DSCav1 3sug	CP-D3+DS, RH	51-304		1135
CP RBD51-307 10mut DS-Cav1	CP-D3, RH	51-307		1136
CP RBD51-307 10mut DS-Cav1 2sug	CP-D3, RH, añadir glicanos	51-307		1137
CP RBD51-304 10mut DS-Cav1 3sug	CP-D3, RH, añadir glicanos	51-304		1138
JCB_28	D3+CAV	50-96, 149-306	enlazador GSGGGSG (Seq_1450)	1139
JCB_29	D3+CAV	50-96, 149-306	enlazador GSGGGSG (Seq_1450)	1140
RSVF(+)THS_s_a	CP-D3+DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1141
RSVF(+)THS_s_a_hp2	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1142
RSVF(+)THS_s_a_hp12	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1143
RSVF(+)THS_s_a_hp2_I221 F	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1144
RSVF(+)THS_s_a_hp2_ds	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1145
RSVF(+)THS_s_a_hp23	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105	enlazador GGSGG(Seq_1448)	1146

RSVF(+)THS_s_a_hp123	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105	enlazador GGSGG(Seg_1448)	1147
RSVF(+)THS_s_a A102C-A241C	CP-D3+DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105	Enlazador GGSGG (Seq_1448)	1148
RSVF(+)THS_s_a_hp2 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105	Enlazador GGSGG (Seq_1448)	1149
RSVF(+)THS_s_a_hp12 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1150
RSVF(+)THS_s_a_hp2_I221 F A102C- A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1151
RSVF(+)THS_s_a_hp2_ds A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1152
RSVF(+)THS_s_a_hp23 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1153
RSVF(+)THS_s_a_hp123 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1154
RSVF(+)THS_s_a_hp1234 A102C-A241C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1155
E-CP_RBU51-30714mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1		enlazador GG	1156
E-RBD51-307_14mut_DS –Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1			1157
RSVF(+)THS_s_a_hp1234 A102C-A241C K196C-E60C	CP-D3, RH + DS-Cav1	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	enlazador GGSGG (Seq_1448)	1158
E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS K196C-E60C	CP-D3, RH + DS-Cav1		enlazador GG	1159
E-RBD51-307_14mut_DS –Cav1_THS K196C-E60C	CP-D3, RH + DS-Cav1			1160
E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1		enlazador GG	1161
E-RBD51-307_11mut_DS –Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1			1162
E-CP_RBD51-30711mut-K196C-E60C-DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1		enlazador GG	1163
E-RBD51-30711mut-K196C-E60C-DS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1			1164
GSJnhl	D3 truncado	46-310	enlazador GG	1165
GSJnh2	D3 truncado	46-310	enlazador GG	1166
GSJnh3	D3 truncado	51-305	enlazador GG	1167
GSJnh4	D3 truncado	51-305	enlazador GSG	1168
Dominio III con trímero (22)				

RSVF(+)THS_s	CP-D3+DS-Cav1+Fd	146-306 -	Enlazadores de glicina y Fd	1169
_a_foldon		ggsgg (Seq_1448)--50-105- ggsggsg (Seg_1445) - Fd		
RSVF(+)THS_s_a_hp2_fold on	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C- Fd terminal	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1170
RSVF(+)THS_s_a_hp12_foldon	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C- Fd terminal	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1171
RSVF(+)THS_s_a_hp2_fold on_I221F	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C- Fd terminal	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1172
RSVF(+)THS_s_a_hp2_fold on_ds	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C- Fd terminal	146-306 - ggsgg (Seq_1448) - 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1173
RSVF(+)THS_s_a_foldon A102C-A241C	CP-D3+DS-Cav1+Fd	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1174
RSVF(+)THS_s_a_hp2_fold on A102C- A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C- Fd terminal	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1175
RSVF(+)THS_s_a_hp12_fol don A102C- A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 -ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1176
RSVF(+)THS_s_a_hp2_fold on_1221F A102C-A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1177
RSVF(+)THS_s_a_hp2_fold on_ds A102C-A241C	CP-D3+ RH+DS-Cav1+C-terminal Fd	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 -ggsggsg (Seg_1445) - Fd	Enlazadores de glicina y Fd	1178
GSJnhFdl	D3 truncado+Fd		Fd	1179
GSJnhFd2	D3 truncado+Fd		Fd	1180
MS_01	D3+C-terminal CCMPTD	51-103, 146- 307	Vuelta de enlazador GGPGG(Seg_1451), C-terminal CCMPTD	1181
MS_02	D3+C-terminal CCMPTD	51-103, 146- 307	Vuelta de enlazador más largo, GGPGG(Seg_1451), C-terminal CCMPTD	1182
MS_03	D3+N-terminal CCMPTD	51-103, 139-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451), C-terminal CCMPTD	1183
MS_04	D3+N-terminal CCMPTD	51-103, 137-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451) más péptido de fusión, C-terminal CCMPTD	1184
MS_05	D3+N-terminal CCMPTD	51-103, 146-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451), C-terminal CCMPTD	1185
MS_06	CP-D3, C-terminal MTQ-CC	51-103, 146-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451), C-terminal MTQ-CC	1186
MS_07	CP-D3, C-terminal MTQ-CC	51-103, 146-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451), enlazador más largo, C-terminal MTQ-CC	1187
MS_08	CP-D3, N-terminal MTQ-	51-103, 146-	Vuelta GGPGG(Seg_1451), C-	1188

	CC	307	terminal MTQ-CC	
MS_09	CP-D3, N-terminal MTQ-CC	51-103, 139-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451), más péptido de fusión, C-terminal MTQ-CC	1189
MS_10	CP-D3, N-terminal MTQ-CC	51-103, 139-307	Vuelta GGPGG(Seg_1451) Más péptido de fusión,C-terminal MTQ-CC	1190
Dominio III en Tyem (18)				
GSJnhI-TWIN	TD3	(47-307, 103GG147)GSG(47-307, 103GG147)	Enlazadores de glicina	1191
GSJnh2-TWIN	TD3	(47-307, 104GSG146)GSG(47-307, 104GSG146)	Enlazadores de glicina	1192
GSJnh3-TWIN	TD3	(51-305, 103GG147)GSG(51-305, 103GG147)	Enlazadores de glicina	1193
GSJnh4-TWIN	TD3	(51-305, 104GSG146)GSG(51-305, 104GSG146)	Enlazadores de glicina	1194
GSJnhI-TWINLg	TD3	(47-307, 103GG147)GGGSGGGG(47-307, 103GG147)	Enlazadores de glicina	1195
GSJnh2-TWINLg	TD3	(47-307, 104GSG146)GGGSGGGG(47-307, 104GSG146)	Enlazadores de glicina	1196
GSJnh3-TWINLg	TD3	(51-305, 103GG147)GGGSGGGG(51-305, 103GG147)	Enlazadores de glicina	1197
GSJnh4-TWINLg	TD3	(51-305, 104GSG146)GGGSGGGG(51-305, 104GSG146)	Enlazadores de glicina	1198
LC-DH01	CP-TD3+enlazador largo	145-306, 52-96	enlazador GGGSGGGSGGGSGGG (Seq_1452))	1199
LC-DH02	CP-TD3+enlazador largo+DS	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGGSGGG (Seq_1452)	1200
LC-DH03	CP-TD3+enlazador corto	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGG (Seq_1453)	1201
LC-DH04	CP-TD3+enlazador corto	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGG (Seq_1453)	1202

LC-DH05	LM conductor +CP-TD3+enlazador corto	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGG (Seq_1453)	1203
LC-DH06	LM conductor +CP-TD3+enlazador corto+DS	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGG (Seq_1453)	1204
LC-DH07	LM conductor+CP-TD3+enlazador largo	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGGSGGG (Seq_1452)	1205
LC-DH08	LM conductor+CP-TD3+enlazador largo+DS	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGGSGGG (Seq_1452)	1206
LC-DH09	LM conductor+CP-TD3+enlazador largo+Arg	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGG (Seq_1453)	1207
LC-DH10	LM conductor+CP-TD3+ enlazador largo+Arg+DS	145-306, 52-96	Enlazador GGGSGGGSGGG (Seq_1453)	1208
Dominio III en Tándem con un trímero (10)				
GSJnh1Fd- TWIN	TD3+Fd	(47-307, 103GG147)GG-Fd-GG(47-307, 103GG147)	Enlaz Enlazadores de glicina	1209
GSJnh2Fd- TWIN	TD3+Fd	(47-307, 104GSG146)GG-Fd-GG(47-307, 104GSG146)	Enla Enlazadores de glicina	1210
GSJnh3Fd- TWIN	TD3+Fd	(51-305, 103GG147)GG-Fd-GG(51-305, 103GG147)	Enla Enlazadores de glicina	1211
GSJnh4Fd- TWIN	TD3+Fd	(51-305, 104GSG146)GG-Fd-GG(51-305, 104GSG146)	Enla Enlazadores de glicina	1212
GSJnhFd3a TWIN	TD3+Fd	(F1/GSG/F2/Fd/ F1/GSG/F2/Thbn/H/S)	Enla Enlazadores de glicina	1213
GSJnhFd3b TWIN	TD3+Fd	(H/S/Thbn/F1/GSG/F2/Fd/Glicina F1/GSG/F2)	EnlEnlazadores de glicina	1214
GSJnhI-TWINGFd	TD3+Fd	(47-307, 103Fd147)GSGGSG (47-307, 103GG147)	Enl Enlazadores de glicina	1215
GSJnh2-TWINGFd	TD3+Fd	(47-307, 104Fd146)GSGGSG (47-307, 104GSG146)	Enl Enlazadores de glicina	1216
GSJnhI-TWINFdG	TD3+Fd	(47-307, 103Fd147)GSGGSG (47-307, 103GG147)	Enl Enlazadores de glicina	1217
GSJnh2-TWINFdG	TD3+Fd	(47-307, 104Fd146)GSGGSG (47-307, 104GSG146)	Enl Enlazadores de glicina	1218

Tabla 21. Inmunógenos del sitio mínimo Ø en una nanopartícula de proteína

Nombre de Construcción	Concepto	**Partícula**	**Región F de RSV F (residuo nºs)**	**Armazón u otra proteína añadida**	**Etiqueta His (N, I o C)**	**SEQ ID NO**
Dominio III en ferritina (45)						
GSJnh1F	TD3+Fer	Fer	46-103 GG 147-310	Enlazador GG, Fer C-terminal	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1219

GSJnh2F	TD3+Fer	Fer	46-104 GSG 146-310	Enlazador GSG, Fer C-term.	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1220
GSJnh3F	TD3+Fer	Fer	51-103 GG 147-305	Enlazador GG, Fer C-term.	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1221
GSJnh4F	TD3+Fer	Fer	51-104 GSG 146-305	Enlazador GSG, Fer C-term.	N-H8-Strep-GG-Thr-GGS	1222
TK_01	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1223
TK_02	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1224
TK_03	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1225
TK_04	CP-SØ+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1226
TK_05	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1227
TK_06	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1228
TK_07	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1229
TK_08	CP-SØ+CAV+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1230
TK_09	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1231
TK_10	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1232
TK_11	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1233
TK_12	CP-SØ+CAV+DS+DPS	Dps	59-97 ,194-240	Dps	N-H6-Thr	1234
TK_13	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-305	Fer	N-H6-Thr	1235
TK_14	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-306	Fer	N-H6-Thr	1236
TK_15	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-307	Fer	N-H6-Thr	1237
TK_16	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-308	Fer	N-H6-Thr	1238
TK_17	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-309	Fer	N-H6-Thr	1239
TK_18	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-310	Fer	N-H6-Thr	1240
TK_19	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-311	Fer	N-H6-Thr	1241
TK_20	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-312	Fer	N-H6-Thr	1242
TK_21	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-313	Fer	N-H6-Thr	1243
TK_22	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-314	Fer	N-H6-Thr	1244
TK_23	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-315	Fer	N-H6-Thr	1245
TK_24	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-316	Fer	N-H6-Thr	1246
TK_25	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-317	Fer	N-H6-Thr	1247
TK_26	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-318	Fer	N-H6-Thr	1248
TK_27	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-319	Fer	N-H6-Thr	1249

TK_28	D3+DS+CAV+Fer	Fer	53-97 ,148-320	Fer	N-H6-Thr	1250
TK_29	D3+DS+RH+Fer	Fer	53-104 ,145-307	Fer	N-H6-Thr	1251
TK_30	D3+DS+RH+Fer	Fer	53-104 ,145-307	Fer	N-H6-Thr	1252
RSVF(+)THS_s_a+Fer_31n	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 - sgg-Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1253
RSVF(+)THS_s_a_hp2+Fer_31n	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 - sgg-Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1254
RSVF(+)THS_s_a+Fer_51n	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 - ggsgg(Seq_1448) - Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1255
RSVF(+)THS_s_a_hp2+Fer_51n	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 - ggsgg(Seq_1448) - Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1256
RSVF(+)THS_s_a_hp12+Fer_51n	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 - ggsgg(Seq_1448) - Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1257
RSVF(+)THS_s_a_hp2+Fer_31n_I221F	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq_1448)- 50-105 - sgg-Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1258
RSVF(+)THS_s_a_hp2+Fer_51n_I221F	CP-D3, RH + DS-Cav1+Fer	Fer	146-306 - ggsgg(Seq 1448)- 50-105 - ggsgg(Seq_1448) - Fer	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1259
MP1	D3+Cav+Fer	Fer	50-306 GSG	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1260
MP2	D3+Cav+Fer	Fer	50-306 GGSGG(Seq_1448)	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1261
MP10	D3+Fer	Fer	sc-GGSGG(Seq_1448)	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1262
MP11	D3+Fer	Fer	sc-GGSGG(Seq_1448)	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1263
Epítopo mínimo con trímero en ferritina (1)						

MP9		CP-SØ mínimo + dominio de trimerización de +ATCasa +Fer	Fer	56-76 G- ATCasa-G- 189-	MP9	
Dominio III con trímero en ferritina (4)						
GSJnh1Fd-F	scD3 truncado+Fd+Fer	Fer	46-310	103GG147, C-term. Fd-Fer	N-H8StrepGG-Thr-GGS	1265
GSJnh2Fd-F	scD3 truncado+Fd+Fer	Fer	46-310	104GSG146, C-term. Fd-Fer	N-H8StrepGG-Thr-GGS	1266
GSJnh3Fd-F	scD3 truncado+Fd+Fer	Fer	51-305	103GG147, C-term. Fd-Fer	C-term. H8StrepGG-Thr-GGS	1267
GSJnh4Fd-F	sc D3 truncado+Fd+Fer	Fer	51-305	104GSG146, C-term. Fd-Fer	C-term. H8StrepGG-Thr-GGS	1268
Epítopo mínimo en ferritina (10)						
JCB_22	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	enlazador PGG, Fer	N-H6-HRV3C	1269
JCB_23	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	enlazador PGG, Fer	N-H6-HRV3C	1270
JCB_24	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	enlazador PGG, Fer	N-H6-HRV3C	1271
JCB_25	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	enlazador GSG, Fer	N-H6-HRV3C	1272
JCB_26	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	enlazador GSG, Fer	N-H6-HRV3C	1273
JCB_27	CP-SØ+Fer	Fer	60-94, 192-229	enlazador GSG, Fer	N-H6-HRV3C	1274
2m0e-resurf1-Fer	SØ mínimo en a 2M0E+Fer	Fer		Fragmento de dedo de zinc 6 de Miz-1 (2M0E) +Fer	N-Strep, H6, Thr	1275
2m0e-resurf1-Fer	SØ mínimo en a 2M0E+Fer	Fer		Fragmento de dedo de zinc 6 de Miz-1 (2M0E) +Fer	N-Strep, H6, Thr	1276
MP3	CP-SØ+Fer	Fer	56-97 GG 189-240 GSG	Enlazador GG+Fer	N-Strep-H8-Thr	1277
MP4	CP-SØ+Fer	Fer	same as MP3 with GGSGG(Seq_1448)	Enlazador GGSGG (Seq_1448)+ Fer	N-Strep-H8-Thr	1278
Epítopo mínimo en LS (2)						
2m0e-resurf1-LS	SØ mínimo en a 2M0E+LS	LS		LS	C-term. Thr H6-strep	1279
2m0e-resurf1-1y12	SØ mínimo en HCP a 2M0E+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1280
Dominio III en LS (2)						
LS1-E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1 THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+LS	LS		LS	N-Strep, H6, Thr	1281
LS2-E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+LS	LS		LS	N-Strep, H6, Thr	1282

Dominio III en hcp1 (4)						
1y12- E-CP_RBD51-307_11mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1283
1y12- E-RBD51-307_11mut_DSCav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1284
1y12- E-CP_RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1285
1y12- E-RBD51-307_14mutDS-Cav1_THS	CP-D3, RH + DS-Cav1+hcp1	HCP1		HCP1	C-term. Thr H6-strep	1286
Dominio III en hcp1 (4)						
JCB_1_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-232	Enlazador PGG+Fer	N-Strep-H8-Thr	1287
JCB_2_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-232	Enlazador PGG, DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1288
JCB_5_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-232	Enlazador GSG, DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1289
JCB_7_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-229	Enlazador GSG+Fer	N-Strep-H8-Thr	1290
JCB_8_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+Fer	Fer	60-94, 192-229	Enlazador GSG, DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1291
JCB_28_GSGGGSG_ferr	D3+CAV+Fer	Fer	53-96, 149-304	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1292
TZ_09r_GGSG_ferr	CP-SØ+DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1293
TZ_12r_GGSG_Ferr	CP-SØ+DS+CAV+charge+Fer	Fer	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1294
TZ_13r_GGSG_Ferr	CP-SØ+DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1295
TZ_14r_GGG_Ferr	CP-SØ+DS+CAV+glycan+Fer	Fer	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1296
Site_0_1chd_3_GYC_GGSGGSGGSGGSGGG_ferr	CP-SØ+CAV+RH+DS + section of 1CHD scaffold+Fer	Fer	60-95, 192-240	Fragmento de metilesterasa CheB (1CHD)+Fer	N-Strep-H8-Thr	1297
JG_circ1_sol_ds_ferr	CP-SØ+DS+Fer	Fer	60-94, 193-237	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1298
JG_2KN0_ferr	CP-SØ+section of TENC1 (2KNO) scaffold+Fer	Fer	60-75, 193-218	Enlazadores de glicina +TENC 1 (2KNO) armazón+Fer	N-Strep-H8-Thr	1299
JG_Circ2_ferr	CP-SØ+Fer	Fer	60-75, 193-218	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1300
JG_Circ2_sol_Ferr	CP-SØ+Fer	Fer	60-75, 193-218	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1301
GSJnh2-Fer	Truncated sc D3	Fer	46-310	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1302
GSJnh3-Fer	Truncated sc D3	Fer	51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1303
GSJnh4-Fer	Truncated sc D3	Fer	51-305	enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1304
GSJnh2-TWIN-Fer	TD3	Fer	47-307, 47-307	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1305
GSJnh3-TWIN-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1306
GSJnh4-TWIN-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1307

GSJnh2Fd-TWIN-Fer	TD3 with Fd	Fer	47-307, 47-307	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer p -	N- H8-Strep-Thr	1308
GSJnh4Fd-TWIN-Fer	TD3 with Fd	Fer	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N- H8-Strep-Thr	1309
GSJnhFd2-Fer	TD3 with Fd	Fer		Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N- H8-Strep-Thr	1310
GSJnh2-TWINLg-Fer	TD3	Fer	47-307, 47-307	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1311
GSJnh3-TWINLg-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1312
GSJnh4-TWINLg-Fer	TD3	Fer	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1313
RSVF(+)THS_s_a A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq 1448)-50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1314
RSVF(+)THS_s_a_foldon A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1315
RSVF(+)THS_s_a_hp12 A102C-A241C_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1316
RSVF(+)THS_s_a_hp123 A102C-A241C_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1317
RSVF(+)THS_s_a_hp1234 A102C-A241C_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1318
RSVF(+)THS_s_a_hp123_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1319
RSVF(+)THS_s_a_hp2 A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1320
RSVF(+)THS_s_a_hp23 A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1321
RSVF(+)THS_s_a_hp23_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1322

RSVF(+)THS_s_a_hp2_ds A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1323
RSVF(+)THS_s_a_hp2_ds_ggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg-50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1324
RSVF(+)THS_s_a_hp2_I221F A102C-A241C_sgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1325
C-Trímero Fer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSG	CP-SØ+Fer	Fer		Enlazadores de glicina, Fer	N-Conductor-Strep-HISx6-Thr	1326
Monómeros en LS (44)						
JCB_1_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-232	APGG enlazador+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1327
JCB_2_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-232	APGG enlazador, DS+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1328
JCB_5_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-232	AGSG enlazador, DS+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1329
JCB_7_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-229	GSG enlazador+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1330
JCB_8_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+LS	LS	60-94, 192-229	GSG enlazador, DS+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1331
JCB_28_GSGGSG_LS	D3+CAV+LS	LS	53-96, 149-304	Enlazadores de glicina+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1332
TZ_12r_GGSGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+LS	LS	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1333
TZ_13r_GGSGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1334
TZ_14r_GGSGSG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1335
Site_Ø_1chd_3_GYC_GGSGGSGGSGGSGGG_LS	CP-SØ+CAV+RH+DS + section of 1CHD scaffold+LS	LS	60-95, 192-240	CheB methylesterase fragment (1CHD)+LS	C-term. Thr-H6Strep	1336
JG_circ1_sol_ds_LS	CP-SØ+DS+LS	LS	60-94, 193-237	Enlazadores de glicina+LS	C-Thr-His-Strep	1337
JG_2KN0_LS	CP-SØ+section of TENC1 (2KNO) scaffold+LS	LS	60-75, 193-218	Enlazadores de glicina+TENC1 (2KNO) scaffold+Fer	C-Thr-His-Strep	1338
JG_Circ2_LS	CP-SØ+LS	LS	60-75, 193-218	Enlazadores de glicina+LS	C-Thr-His-Strep	1339
JG_Circ2_sol_LS	CP-SØ+LS	LS	60-75, 193-218	Enlazadores de glicina+LS	C-Thr-His-Strep	1340

GSJnh2-LS	Truncated sc D3	LS	46-310	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1341
GSJnh3-LS	Truncated sc D3	LS	51-305	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1342
GSJnh4-LS	Truncated sc D3	LS	51-305	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1343
GSJnh2-TWIN-LS	TD3	LS	47-307, 47-307	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1344
GSJnh3-TWIN-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1345
GSJnh4-TWIN-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1346
GSJnh2Fd-TWIN-LS	TD3 with Fd	LS	47-307, 47-307	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N- H8-Strep-Thr	1347
GSJnh4Fd-TWIN-LS	TD3 with Fd	LS	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N- H8-Strep-Thr	1348
GSJnhFd2-LS	TD3 with Fd	LS		Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N- H8-Strep-Thr	1349
GSJnh2-TWINLg-LS	TD3	LS	47-307, 47-307	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1350
GSJnh3-TWINLg-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1351
GSJnh4-TWINLg-LS	TD3	LS	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, LS	N- H8-Strep-Thr	1352
RSVF(+)THS_s_a_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448) - 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1353
RSVF(+)THS_s_a_hp2_gaggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg(Seq_1448) - 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1354
RSVF(+)THS_s_a_hp12_gaggggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1355
RSVF(+)THS_s_a_hp2_I221F_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1356
RSVF(+)THS_s_a A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1357
RSVF(+)THS_s_a_hp12 A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1358
RSVF(+)THS_s_a_hp123_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + DS- Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1359

RSVF(+)THS_s_a_hp123 A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1360
RSVF(+)THS_s_a_hp1234 A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1361
RSVF(+)THS_s_a_hp2 A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1362
RSVF(+)THS_s_a_hp2_ds_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1363
RSVF(+)THS_s_a_hp2_ds A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1364
RSVF(+)THS_s_a_hp2_I221F A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1365
RSVF(+)THS_s_a_hp23_gaggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1366
RSVF(+)THS_s_a_hp23 A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1367
C-Trímero LS: conductor-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG	CP-SØ+LS	LS		Enlazador de glicina+LS	N-Conductor-Strep-HISx6-Thr	1368
C-Trímero LS: conductor-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-LS-Thr-HISx6-Strep:	CP-SØ0+LS	LS		Enlazador de glicina+LS	C-Conductor-Thr-H6-Strep	1369
Trímeros en ferritina (30)						
JCB_13_GSGGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+Fer	Fer	60-94, 192-232	Enlazador APGG, GCN4, inter-DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1370
JCB_19_GSGGSG_ferr	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+Fer	Fer	60-94, 192-229	Enlazador GSG, GCN4, inter-DS+Fer	N-Strep-H8-Thr	1371
TZ_05_GGSG_ferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge+Fer	Fer	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1372

TZ_08r_GGSG_ferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+glycan +Fer	Fer	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1373
TZ_15_GGSG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CXVIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+CXVIII+ Fer	N-Strep-H8-Thr	1374
TZ_16_GGSG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+CXVIII +Fer	Fer	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+CXVIII+ Fer	N-Strep-H8-Thr	1375
TZ_17_GGSGSG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+CXVIII +Fer	Fer	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+CXVIII+ Fer	N-Strep-H8-Thr	1376
TZ_19_GGSGSGG_3Hferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge +glycan+CXVII I+Fer	Fer	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+CXVIII+ Fer	N-Strep-H8-Thr	1377
TZ_19_GGSGG_ferr	CP-SØ+interchain DS+CAV+charge +glycan+Fer	Fer	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1378
TZ_20_GGSGSGG_3Hferr	CP-SØ+DS+CAV+cha rge+glycan+CX VIII+Fer	Fer	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+CXVIII+ Fer	N-Strep-H8-Thr	1379
MS_03_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	D3+N-term. CCMPTD+Fer	Fer	51-103, 139-307	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1380
MS_05_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	D3+N-term. CCMPTD+Fer	Fer	51-103, 146-307	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1381
MS_07_GSGGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	CP-D3, C-term. MTQ- CC+Fer	Fer	51-103, 146-307	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1382
MS_08_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	CP-D3, C-term. MTQ-CC+Fer	Fer	51-103, 146-307	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1383
MS_09_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_Ferr	CP-D3, C-term. MTQ-CC+Fer	Fer	51-103, 139-307	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-Thr	1384
GSJnh2-Fer A74C E218C	Truncated sc D3, interchain DS	Fer	46-310	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1385
GSJnh3-Fer A74C E218C	Truncated sc D3, interchain DS	Fer	51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1386
GSJnh4-Fer A74C E218C	Truncated sc D3, interchain DS	Fer	51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1387
GSJnh4-TWIN-Fer A74C E218C	TD3, interchain DS	Fer	51-305, 51-305	Enlazadores de glicina, Fer	N- H8-Strep-Thr	1388
RSVF(+)THS_s_a_foldon_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1389
RSVF(+)THS_s_a_hp12_foldon A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1390
RSVF(+)THS_s_a_hp12_foldon_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1391

RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1392
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_ds A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105	Enlazadores de glicina, Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1393
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_ds_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1394
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1395
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_I221F A102C-A241C_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1396
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_I221F_ggsggggsgg_ferr	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	Fer	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+Fer	N-Strep-H8-HRV3C	1397
C-Trímero 1GQ3-Fer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-KI-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSG-Fer	CP-SØ+C-term. ATCase+Fer	Fer		Enlazadores de glicina+ATCase (1GQ3)+Fer	N-Conductor-Strep-HISx6-Thr	1398
C-Trímero 1GQ3-Fer: leader-Strep-HISx6- Thr-L1H1-KI-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG -Fer	CP-SØ+C-term. ATCase+Fer	Fer		Enlazadores de glicina+ATCas e (1GQ3)+Fer	N-Conductor-Strep-HISx6-Thr	1399
Trímeros en LS (30)						
JCB_13_GSGGGSG_LS	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+LS	LS	60-94, 192-232	Enlazador APGG, GCN4, inter- DS+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1400

JCB_19_GSGGSG_LS	CP-SØ+CAV+DS+GCN4+LS	LS	60-94, 192-229	Enlazador GSG, GCN4, inter-DS+LS	C-term. Thr, Strep, y H8	1401
TZ_05_GGSGGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+LS	LS	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1402
TZ_08r_GGSGGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1403
TZ_09r_GGSGGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+glycan+LS	LS	192-242, 60-97	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1404
TZ_15_GGG-LS	CP-SØ+DS+LS	LS	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1405
TZ_16_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+LS	LS	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1406
TZ_17_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+LS	LS	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1407
TZ_19_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+LS	LS	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1408
TZ_20_GGG_LS	CP-SØ+DS+CAV+charge+glycan+LS	LS	58-97, 192-242	Enlazadores de glicina+LS	N-Strep-H8-Thr	1409
MS_03_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	D3+N-term. CCMPTD+LS	LS	51-103, 139-307	Enlazadores de glicina+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thr	1410
MS_05_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	D3+N-term. CCMPTD+LS	LS	51-103, 146-307	Enlazadores de glicina+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thr	1411
MS_07_GSGGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	CP-D3, C-term. MTQ-CC+LS	LS	51-103, 146-307	Enlazadores de glicina +CCMPT	N-Strep-H8-Thr	1412
MS_08_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	CP-D3, C-term. MTQ- CC+LS	LS	51-103, 146-307	Enlazadores de glicina+CCMPTD+LS T h r	N-Strep-H8-Thr	1413
MS_09_GGGSSGSGGGSSGGGSSGGGS_LS	CP-D3, C-term. MTQ- CC+LS	LS	51-103, 139-307	Enlazadores de glicina+CCMPTD+LS	N-Strep-H8-Thrombin	1414
RSVF(+)THS_s_a_foldon_gagggsggsgggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105+Fd	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1415
RSVF(+)THS_s_a_foldon A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105+Fd	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1416
RSVF(+)THS_s_a_hp12_foldon_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105+Fd	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-RV3C	1417
RSVF(+)THS_s_a_hp12_foldon A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1418

RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105+Fd	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1419
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq 1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1420
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_ds_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH + DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1421
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_ds A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH +DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadore de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1422
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_I221F_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH +DS-Cav1 + Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105 - ggsggsg (Seq_1445) - Fd	Enlazadores de glicina+T4 Fd+LS	N-Strep-H8-HRV3C	1423
RSVF(+)THS_s_a_hp2_foldon_I221F A102C-A241C_gagggsggsggsggg_1s	CP D3 + EH +DS-Cav1+Fd	LS	146-306 - ggsgg (Seq_1448)- 50-105+Fd	Enlazadores de glicina, LS	N-Strep-H8-HRV3C	1424
C-Trímero 1GQ3-LS_60mer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSG-LS	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Enlazadores de glicina+E coli ATCase (1GQ3)+LS	N-Conductor-Strep-HISx6-Thr	1425
C-Trímero 1GQ3-LS_60mer: leader-Strep-HISx6-Thr-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG-LS	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Enlazadores de glicina+E coli ATCase (1GQ3)+LS	N-Conductor-Strep-HISx6-Thr	1426
C-Trímero 1GQ3-LS_60mer: leader-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSG-LS-Thr-HISx6-Strep	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Enlazadores de glicina+E coli ATCase (1GQ3)+LS	C-Conductor-Thr-H6-Strep	1427
C-Trímero 1GQ3-LS_60mer: leader-L1H1-K1-H2L2H3-GGSGGGSG-1GQ3-GGSGGGSGGGSGGGSGGGSG-LS-Thr-HISx6-Strep	CP-SØ+C-term. ATCase +LS	LS		Enlazadores de glicina+E coli ATCase (1GQ3)+LS	C-Conductor-Thr-H6-Strep	1428

Ejemplo 15

Inmunogenicidad de la Proteína F estabilizada en prefusión

Se realizó una serie de ensayos (además de aquellos arriba proporcionados) para ilustrar la inmunogenicidad de las proteínas F de RSV recombinantes proporcionadas en la presente que están estabilizadas en una conformación de prefusión. Los resultados muestran que las proteínas F de RSV recombinantes proporcionadas, estabilizadas en una conformación de prefusión, se pueden utilizar para inducir una respuesta inmune en múltiples modelos de animales y, además, que la inducción de esta respuesta inmune protege frente a la estimulación viral futura.

A menos que se indique de otra manera, en las FIGs. 73-84 y en este ejemplo, la referencia se hace a las siguientes proteínas F de RSV recombinantes:

DS (Subtipo A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C (SEQ ID NO: 185)

DS (Subtipo B) = RSV B18537 F(+)FdTHS S155C, S290C (SEQ ID NO: 1479)

DS-Cav1 (Subtipo A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C, S190F, V207L (SEQ ID NO: 371)

DS-Cav1 (Subtipo B) = RSV B18537 F(+)FdTHS S155C, S290C, S190F, V207L (SEQ ID NO: 372)

F de postfusión (Subtipo A) = RSV A2 F(+) dFPTHS

La FIG. 73 ilustra que, utilizyo Ribi como adyuvante, una versión de cadena sencilla de DS-Cav1 presentada en el contexto de una nanopartícula de ferritina dada IM induce una respuesta de anticuerpo neutralizante, pequeña pero detectable, después de 2 semanas en macacos rhesus después de una sola dosis. En base a estas respuestas pequeñas pero detectables después de una dosis se espera que después del refuerzo con una segunda dosis será inducida una respuesta de anticuerpo neutralizante significativa. Esto sería consistente con la inmunogenicidad de 2 mcg del trímero F de prefusión estabilizado en DS escindido presentado en una nanopartícula de ferritina formulada con Ribi después de 2 dosis en ratones, comentado más adelante.

Como se ilustra en la FIG. 74, los ratones (CB6F1/J) con una respuesta inmune a la versión DS de la prefusión estabilizada se indujo en ratones inmunizados con 20 mcg de DS F en 50 mcg de poli ICLC las semanas 0 y 3. La actividad neutralizante se mantuvo en un alto nivel en los ratones inmunizados con DS durante más de 12 semanas.

Como se ilustra en la FIG. 75, la inmunización con DS (Subtipo A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C (SEQ ID NO: 185) puede prevenir la infección por RSV en un modelo de animal. Los ratones se inmunizaron IM con la versión DS de la proteína F estabilizada (SEQ ID NO: 185) la semana 0 y la semana 3. Los ratones se enfrentaron intranasalmente a 10e7 ufp del virus A2 de RSV homólogo la semana 19, cuatro meses después de la última vacunación. El día 5 los pulmones y narices se eliminaron para medir la carga del virus en el tejido. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con la versión DS de F de prefusión no tuvieron virus detectable en el pulmón o la nariz.

Además, los ratones a los que se administró DS (Subtipo A) = RSV A2 F(+)FdTHS S155C, S290C (SEQ ID NO: 185) no se sometieron a una respuesta de citoquina Tipo 2 al inmunógeno (FIG. 76). El contenido de citoquina se midió en los sobrenadantes de pulmón y de nariz el día 5 después de la inmunización inicial con el control (PBS), RSV de tipo salvaje (RSV), RSV inactivado con formalina (FIRSV), DS (SEQ ID NO: 185; "F de prefusión") o una construcción F de postfusión estabilizado (F de postfusión). Los ratones que se someten a la infección primaria tienen niveles significativos de IFN-gamma y MIP-1alfa como se espera. Los ratones inmunizados con FI-RSV tuvieron niveles significativos de citoquinas tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y las citoquinas asociadas con el daño epitelial (IL-6) típico de las respuestas asociadas con la enfermedad potenciada con vacuna. Los ratones inmunizados con F de prefusión (DS) tenían un nivel moderado de IFN-gamma e IL-10 asociados con una respuesta efectiva y regulada y ningún malestar o pérdida de peso.

La actividad de neutralización del suero de modelos de primates no humanos inmunizados con la proteína DSCav1 de F de RSV recombinante (SEQ ID NO: 371) se ensayó durante el curso de una inmunización de tres dosis (FIG. 77). Macacos Rhesus, 4 por grupo, se inmunizaron dos veces a las 0 y 4 semanas con 50 mcg IM ya sea con la F de prefusión de DS-Cav1 (SEQ ID NO: 371) o F de postfusión en base a la secuencia del subtipo A y se formuló con poli ICLC. La semana 26, ambos grupos se reforzaron con 50 mcg IM de F de prefusión de DS-Cav1 formulada con poli ICLC. Después de 2 dosis de DS-Cav1, la actividad neutralizante significativa se induce y se mantiene por encima del umbral protector durante más de 5 meses. La F de postfusión fue inmunogénica e indujo actividad neutralizante detectable después de 2 dosis, pero estaba solo transitoriamente por encima del umbral protector. El refuerzo del grupo de F de postfusión con una 3ª dosis de F de prefusión estabilizada con

DS-Cav1 dio como resultado una elevación en la actividad neutralizante por encima de la lograda después de la 2ª dosis. Después de la 3ª dosis, la actividad neutralizante contra el subtipo A del homólogo se mantuvo establemente durante más de 10 semanas como se resalta en las zonas encasilladas en rojo.

Para demostrar que la construcción DSCav1 se puede formular con aluminio, DSCav1 purificado (SEQ ID NO: 371) se mezcló con el gel de hidróxido de aluminio o gel de fosfato de aluminio en diversas relaciones. Ratones BALB/c se inmunizaron IM con 10 mcg de la versión DS-Cav1 para estabilizar la F de prefusión formulada con aluminio (ya sea gel de hidróxido de aluminio o gel de fosfato de aluminio) en 0 y 3 semanas. Las relaciones de peso:peso de proteína:aluminio se variaron entre 1:1 y 1:10. Todas las formulaciones fueron inmunogénicas (FIG.78). Además, el uso de aluminio como un adyuvante para la inmunización DSCav1 se demostró en un modelo de primates no humanos (FIG. 79). Macacos rhesus se inmunizaron las semanas 0, 4 y 26 con la proteína DS purificada (SEQ ID NO: 185). Las inyecciones en las semanas 0 y 4 estaban comprendidas por la versión DS de F de prefusión de RSV estabilizada (50 mcg) formulada en poli ICLC. El refuerzo de la semana 26 fue 50 mcg de la F estabilizada en prefusión de DS formulada en gel de fosfato de aluminio. Por lo tanto el aluminio es un adyuvante efectivo para la F de prefusión estabilizada en NHP.

Para demostrar que otro protocolo de inmunización es eficaz para inducir una respuesta inmune efectiva con DSCav1, ratones fueron inmunizados con un DSCav1 que expresa vector a base de gen, y se evaluó la respuesta inmune resultante a F de RSV (FIG. 80). Ratones CB6F1/J se inmunizaron con un vector del serotipo 5 de adenovirus recombinante que expresa la versión de tipo salvaje de F a las 0 y 3 semanas o se inmunizaron la semana 0 con rAd5 que expresa la versión DS-Cav1 de la membrana preF anclada (no secretada) y se reforzaron con 10 mcg de DS-Cav1 formulado en aluminio la semana 3. Ratones cebados con rAd5-preF se reforzaron con DS-Cav1 en aluminio que produjeron tanto anticuerpo neutralizante ya que a los ratones se les dieron dos dosis de proteína, indicyo únicamente que la F de prefusión suministrada por un vector a base de gen es inmunogénica y puede cebar un refuerzo de proteína subsiguiente.

Adicionalmente, la proteína DSCav1 fue efectiva para reforzar una respuesta inmune a F de RSV de tipo salvaje (WT) (FIG. 81). Primates no humanos cebados con vectores de adenovirus recombinante que expresan versiones WT de F de RSV (subtipo A) más de 2 años antes del refuerzo, se reforzaron con una dosis de 50 mcg del subtipo A o subtipo B de DS-Cav1 formulada en aluminio. Dos semanas después del refuerzo la actividad neutralizante se incrementó significativamente por ambos del subtipo A y B de las proteínas DS-Cav1 (FIGs. 81-82).

Para demostrar la efectividad del subtipo cruzado de la versión DS (S155C, S290C) de F estabilizada, ratones CB6F1/J se inmunizaron IM con 10 mcg de DS formulado en Ribi la semana 0 y la semana 3 (FIG. 83). El anticuerpo neutralizante se indujo por las proteínas tanto del subtipo A (SEQ ID NO: 185) como del subtipo B (SEQ ID NO: 1479) contra ambos de los virus del subtipo A y B. El grupo que recibe tanto A como B recibió un total de 20 mcg de proteína.

se trató con glicosidasas con versiones mutantes para eliminar los sitios de glicosilación en N27 y N70. La proteína F no podría ser producida si se mutara la glicosilación N500, sugiriendo que la glicosilación en ese sitio es requerida para la expresión. La actividad neutralizante se detectó la semana 5 (barras continuas) y la semana 7 (barras de guiones) en ratones inmunizados por cualquiera de las variantes de glicosilación de F. Sin embargo, la glicosilación alterante parecía reducir la inmunogenicidad comparada con la versión DS original de la F de prefusión estabilizada F. **** = $P < 0.0001$.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno aislado, que comprende:

una proteína F de RSV recombinante o fragmento de la misma que comprende sustituciones de aminoácidos comparada con una proteína F de RSV nativa como se recoge como una de SEQ ID NOs: 1-184 que estabiliza la proteína F de RSV recombinante en una conformación de prefusión que específicamente se une a un anticuerpo específico de prefusión de F de RSV, en donde:

la proteína F de RSV recombinante está estabilizada en la conformación de prefusión de proteína F de RSV mediante sustituciones S155C, S290C, S190F y V207L,

la conformación de prefusión de proteína F de RSV recombinante o fragmento de la misma comprende un sitio antigénico Ø que comprende los residuos 62-69 y 196-209 de una secuencia de proteína F de RSV nativa como se recoge como una de SEQ ID NOs: 1-184,

el inmunógeno específicamente se une al anticuerpo específico de prefusión después de la incubación a 20 °C en solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico durante al menos 24 horas en ausencia del anticuerpo específico de prefusión, y

y el anticuerpo específico de prefusión de F de RSV no se une a una proteína F de RSV en una conformación de postfusión, y

el anticuerpo específico de prefusión es un anticuerpo D25 que comprende los dominios VH y VL establecidos en los SEQ ID NOs 368 y 369, respectivamente.

2. El inmunógeno de la reivindicación 1, en donde la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en una secuencia de aminoácido que comprende al menos 80 % de identidad con los residuos 26-109 y 137-513, respectivamente, o 26-103 y 145-513, respectivamente, o 26-105 y 145-513, respectivamente, de una de SEQ ID NOs: 371 (DS-Cav1, subtipo A), 372 (DSCav1, subtipo B) o 373 (DSCav1, bovino).

3. El inmunógeno de la reivindicación 2, en donde la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en una secuencia de aminoácido que comprende al menos 80 % de identidad con los residuos 26-109 y 137-513, respectivamente, o 26-103 y 145-513, respectivamente, o 26-105 y 145-513, respectivamente, de SEQ ID NO: 371 (DS-Cav1, subtipo A).

4. El inmunógeno de la reivindicación 2, en donde la proteína F de RSV recombinante comprende o consiste en una secuencia de aminoácido que comprende al menos 80 % de identidad con los residuos 26-109 y 137-513, respectivamente, o 26-103 y 145-513, respectivamente, o 26-105 y 145-513, respectivamente, de SEQ ID NO: 372 (DS-Cav1, subtipo B).

5. El inmunógeno de la reivindicación 2, en donde la proteína F de RSV recombinante comprende los residuos 26-109 y 137-513, respectivamente, o 26-103 y 145-513, respectivamente, o 26-105 y 145-513, respectivamente, de SEQ ID NO: 371 (DS-Cav1, subtipo A).

6. El inmunógeno de la reivindicación 2, en donde la proteína F de RSV recombinante comprende los residuos 26-109 y 137-513, respectivamente, o 26-103 y 145-513, respectivamente, o 26-105 y 145-513, respectivamente, de SEQ ID NO: 372 (DSCav1, subtipo B).

7. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende un multímero de la proteína F de RSV recombinante o fragmento de la misma de acuerdo con las reivindicaciones 1-7.

8. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la proteína F de RSV recombinante o fragmento de la misma de acuerdo con las reivindicaciones 1-7 está enlazada a un dominio de trimerización.

9. El inmunógeno de la reivindicación 8, en donde el extremo C del polipéptido F1 de la proteína F de RSV recombinante está enlazado al dominio de trimerización.

10. El inmunógeno de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el dominio de trimerización es un dominio Foldon.

11. El inmunógeno de la reivindicación 8, en donde la proteína F de RSV recombinante enlazada al dominio de trimerización comprende o consiste en una secuencia de aminoácido que comprende al menos 80 % de identidad con los residuos 26-109 y 137-544 o 26-103 y 145-544 de una de SEQ ID NOs: 371 (DS-Cav1, subtipo A), 372 (DSCav1, subtipo B) o 373 (DSCav1, bovino).

12. El inmunógeno de la reivindicación 11, en donde la proteína F de RSV recombinante enlazada al dominio de trimerización comprende o consiste en una secuencia de aminoácido que comprende al menos 80 % de identidad con los residuos 26-109 y 137-544 o 26-103 y 145-544 de SEQ ID NO: 371 (DS-Cav1, subtipo A).

13. El inmunógeno de la reivindicación 11, en donde la proteína F de RSV recombinante enlazada al dominio de trimerización comprende o consiste en una secuencia de aminoácido que comprende al menos 80 % de identidad con los residuos 26-109 y 137-544 o 26-103 y 145-544 de SEQ ID NO: 372 (DS-Cav1, subtipo B).

14. El inmunógeno de la reivindicación 11, en donde la proteína F de RSV recombinante enlazada al dominio de trimerización comprende los residuos 26-109 y 137-544 o 26-103 y 145-544 de SEQ ID NO: 371 (DS-Cav1, subtipo A).

15. El inmunógeno de la reivindicación 11, en donde la proteína F de RSV recombinante enlazada al dominio de trimerización comprende los residuos 26-109 y 137-544 o 26-103 y 145-544 de SEQ ID NO: 372 (DS-Cav1, subtipo B).

16. Una partícula similar a virus, que comprende el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

17. Una nanopartícula de proteína, que comprende el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

18. Una molécula de ácido nucleico, que codifica el inmunógeno o la nanopartícula de proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17.

19. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, enlazada operativamente a un promotor.

20. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 19.

21. El vector de la reivindicación 20, en donde el vector es un vector viral.

22. La molécula de ácido nucleico o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, que comprende la secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 384, SEQ ID NO: 385 o SEQ ID NO: 386.

23. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad efectiva del inmunógeno, la partícula similar a virus, la nanopartícula de proteína, la molécula de ácido nucleico nucleico o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

24. La composición inmunogénica de la reivindicación 23, para uso en un método para generar una respuesta inmune a F de RSV en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición inmunogénica para generar la respuesta inmune.

25. La composición inmunogénica para uso de la reivindicación 24, en donde el método comprende una administración de cebado-refuerzo de la composición inmunogénica.

26. La composición inmunogénica para uso de la reivindicación 24 o 25, en donde el sujeto es un ser humano o un sujeto veterinario.

27. La composición inmunogénica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 25-26, en donde el sujeto es de menos de un año, de más de 65 años, o una mujer embarazada.

28. Un kit que comprende el inmunógeno, la partícula similar a virus, la nanopartícula de proteína, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula huésped o la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27; e instrucciones para utilizar el kit.

29. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para uso para inhibir una infección por RSV en un sujeto.

30. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para uso en un método para inducir una respuesta inmune a una proteína F de RSV en un sujeto.

FIG. 1A Neutralización de RSV

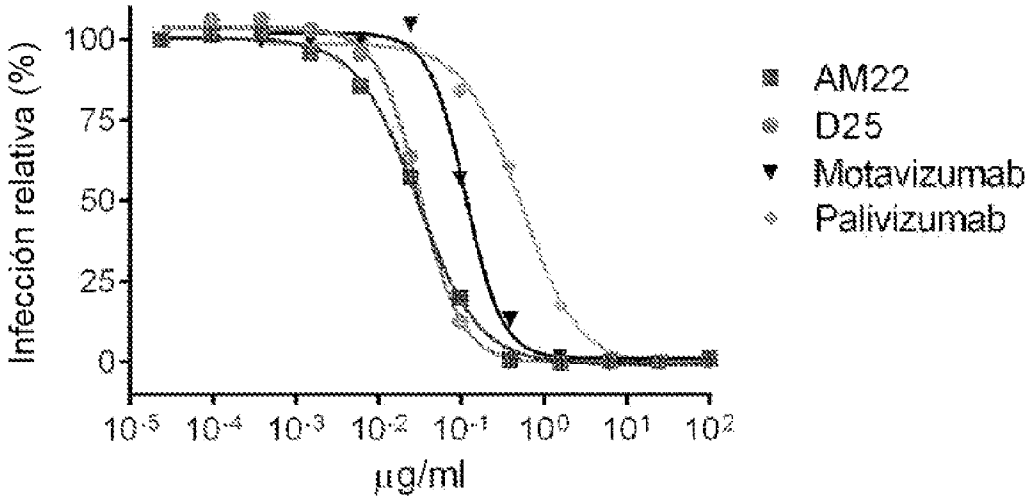


FIG. 1B

Unión a F de RSV postfusión

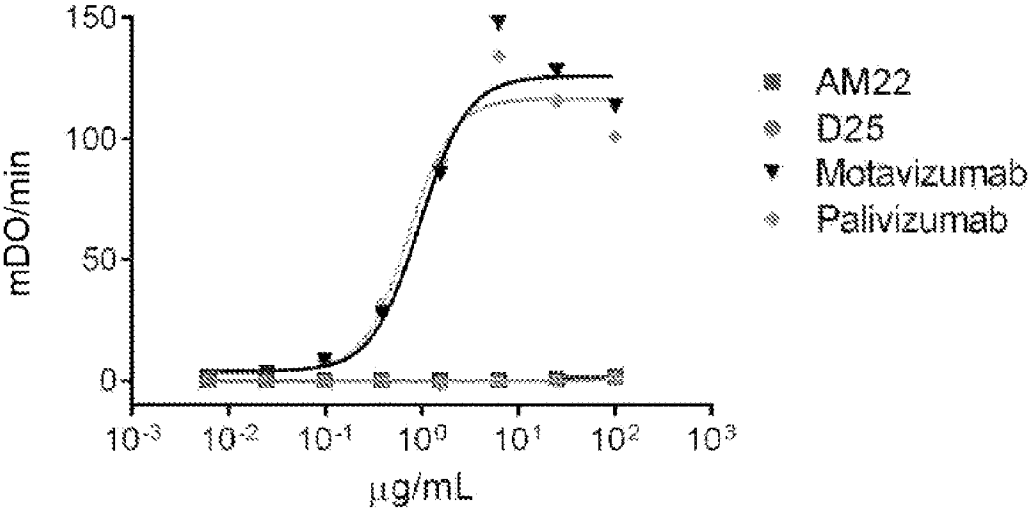


FIG. 1C

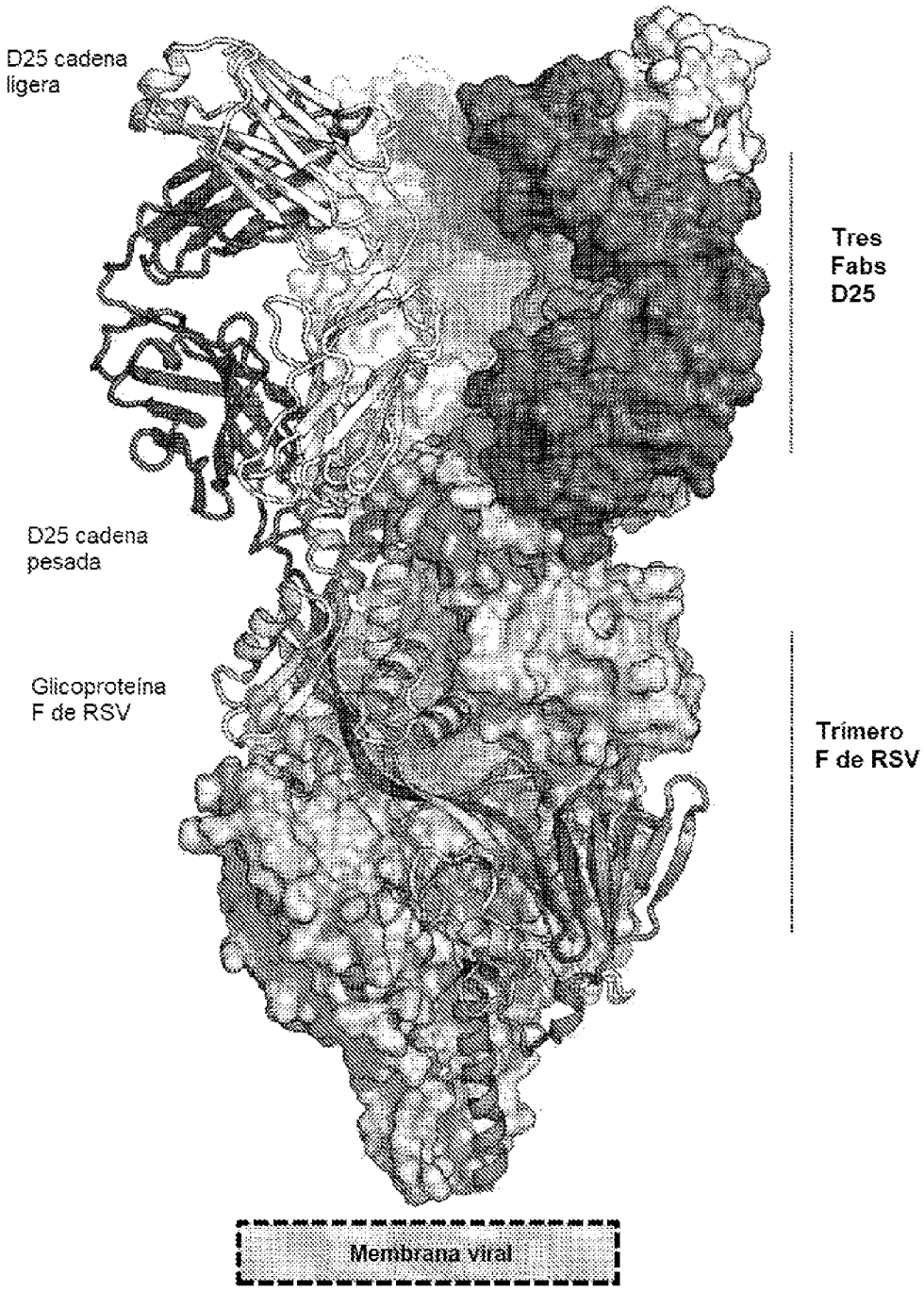

D25 cadena ligera
Tres Fabs D25
D25 cadena pesada
Glicoproteína F de RSV
Trímero F de RSV
Membrana viral

FIG. 2A

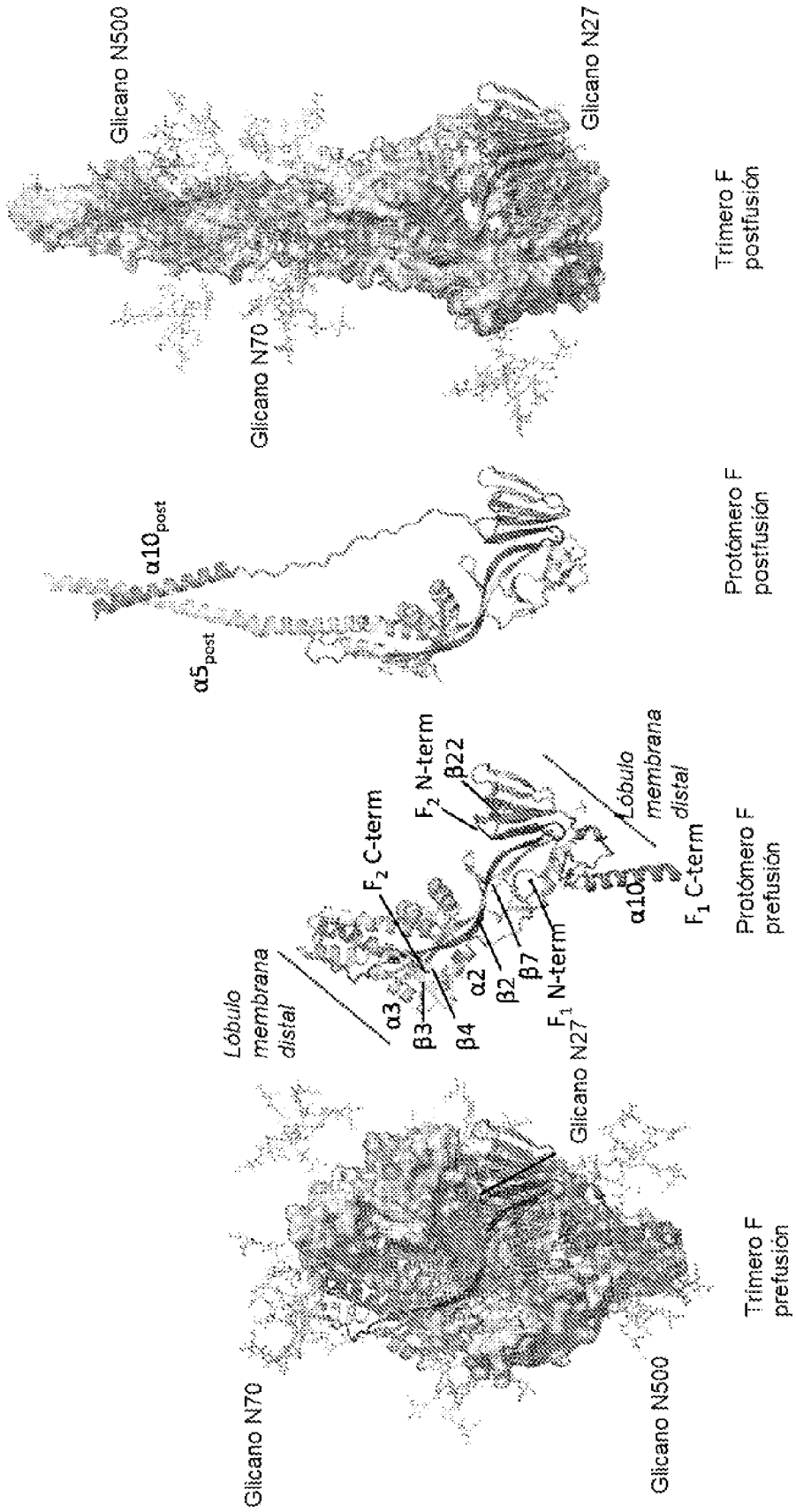

Glicano N500
Glicano N70
Glicano N27
Trímero F postfusión
$\alpha10_{post}$
$\alpha5_{post}$
Protómero F postfusión
Lóbulo membrana distal
F_2 C-term
F_2 N-term
β22
α3
β3
β4
α2
β2
β7
F_1 N-term
Glicano N27
α10
F_1 C-term
Lóbulo membrana distal
Protómero F prefusión
Glicano N70
Glicano N500
Trímero F prefusión

FIG. 2B

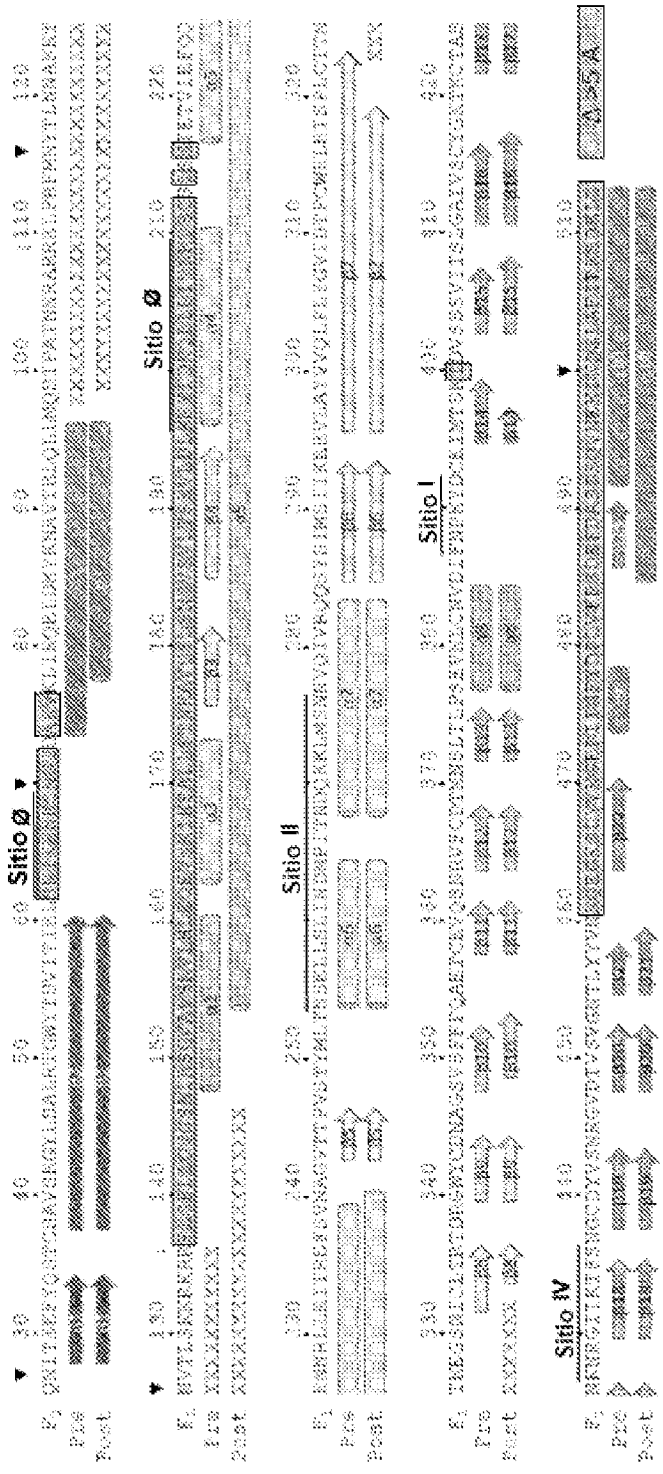


FIG. 3A

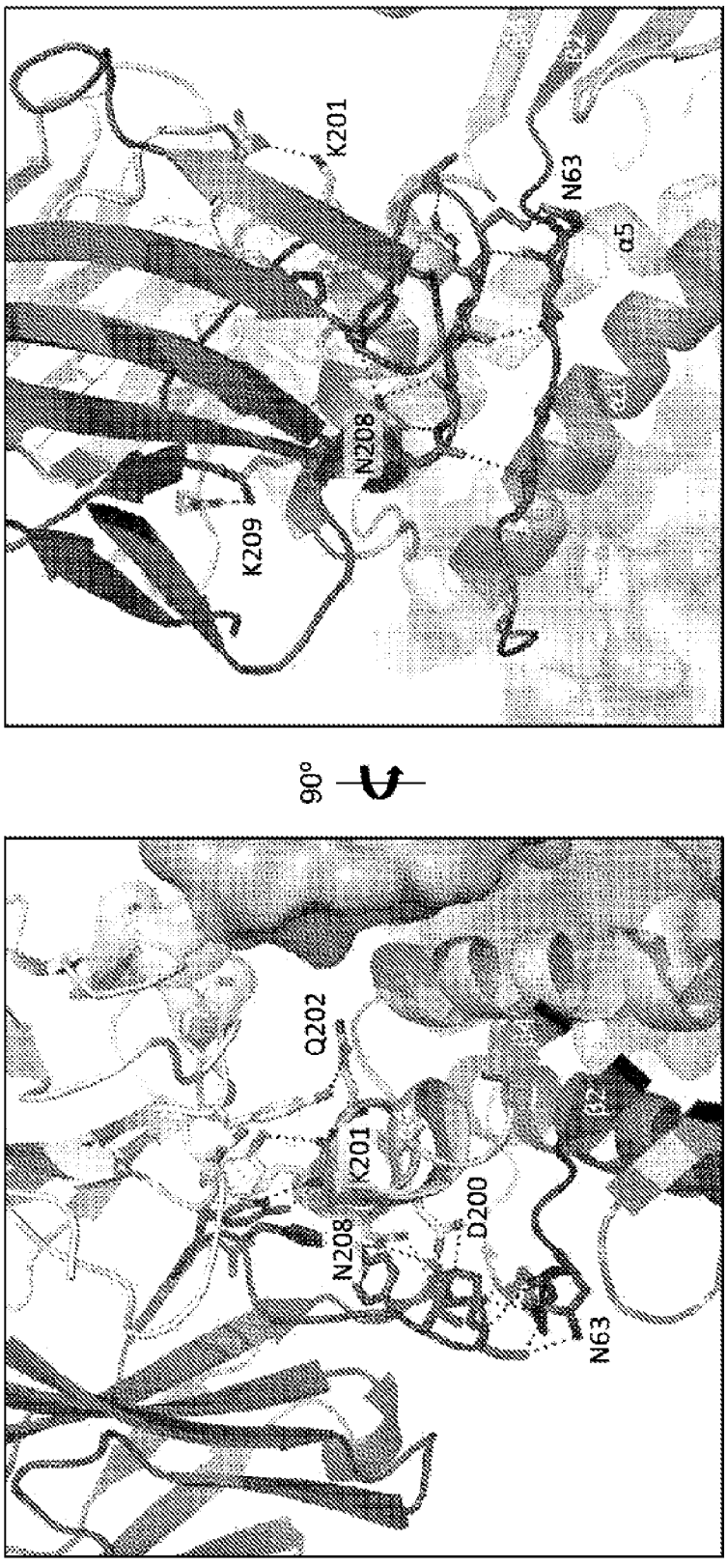


FIG. 3C

	F2	F1	Identidad con secuencia hRSV/A		Cambios como adhesión	
			Sitio antigénico	Ectodominio	Sitio antigénico	Ectodominio
hRSV/A	63-[illegible]~74	196-[illegible]~213				
hRSV/B	63-[illegible]~74	203-[illegible]~213	20/26 (77%)	427/466 (92%)	6/26 (23%)	6/466 (1%)
bRSV	63-[illegible]~74	203-[illegible]~213	13/26 (50%)	403/466 (86%)	12/26 (23%)	12/466 (3%)

FIG. 4A

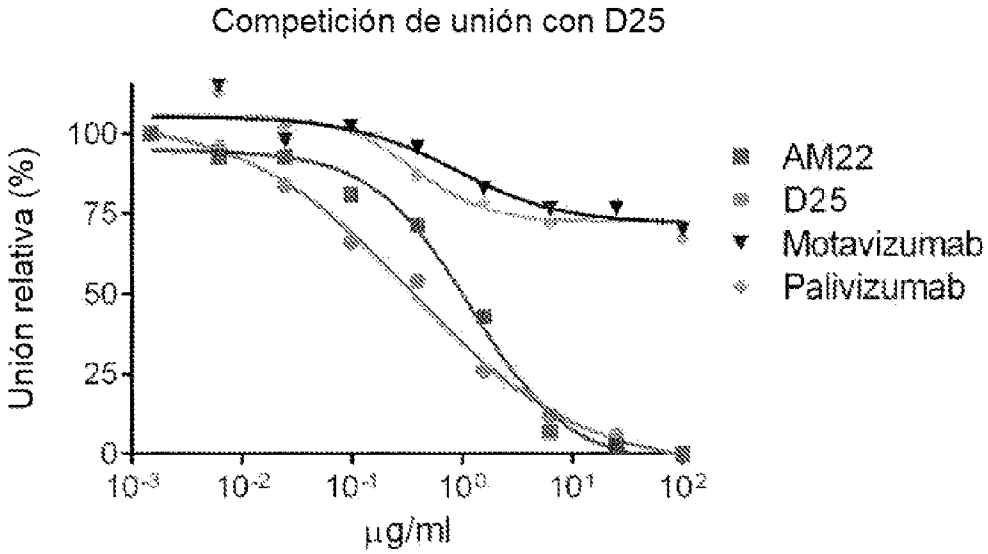

Competición de unión con D25
Unión relativa (%)
100
75
50
25
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
µg/ml
AM22
D25
Motavizumab
Palivizumab

FIG. 4B

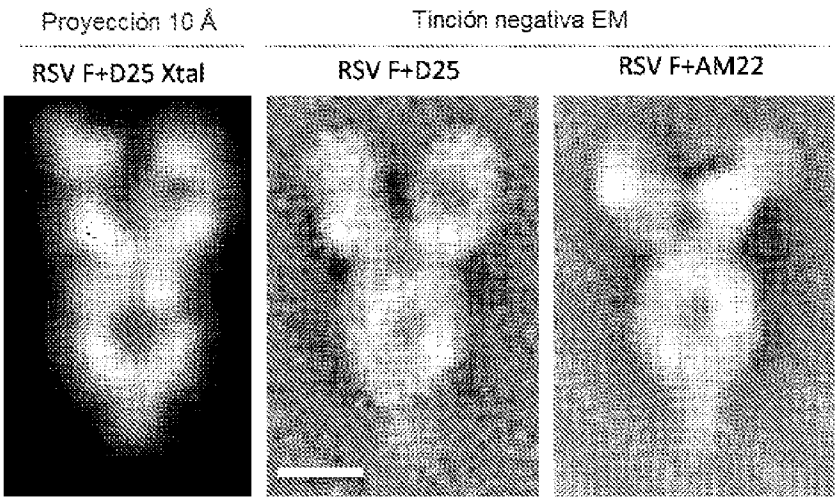

Proyección 10 Å
Tinción negativa EM
RSV F+D25 Xtal
RSV F+D25
RSV F+AM22

FIG. 4C

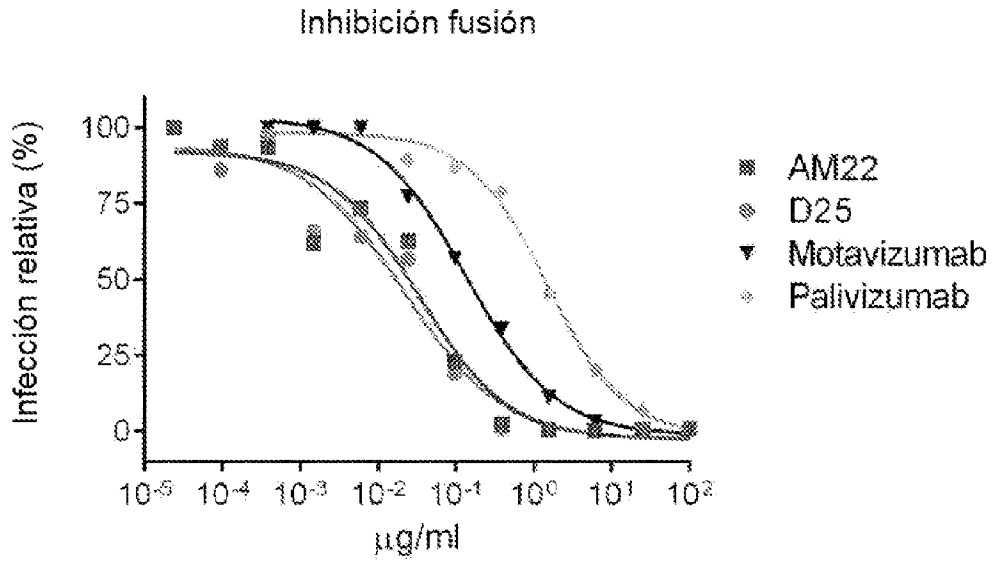

Inhibición fusión
Infección relativa (%)
100
75
50
25
0
10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
µg/ml
AM22
D25
Motavizumab
Palivizumab

FIG. 4D

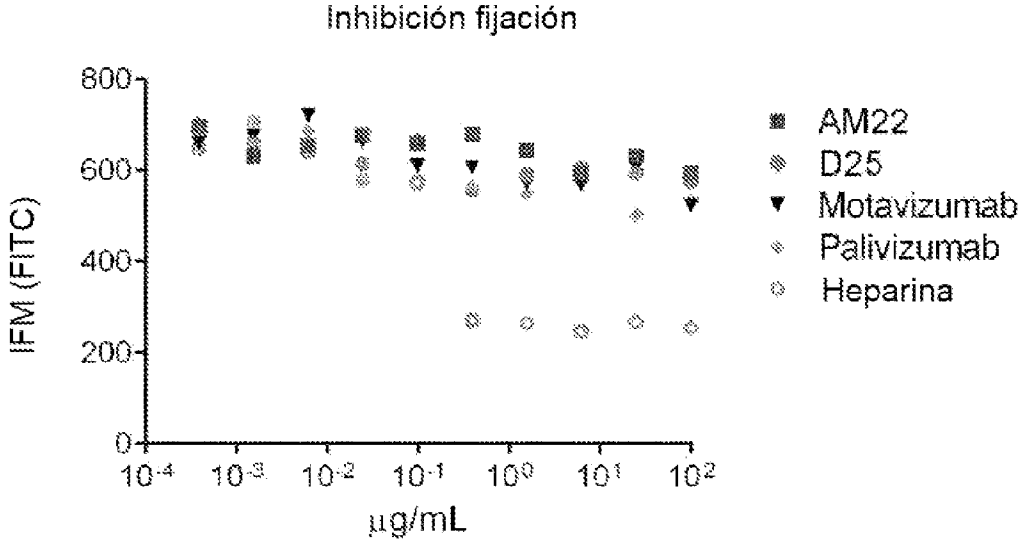

Inhibición fijación
IFM (FITC)
800
600
400
200
0
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
µg/mL
AM22
D25
Motavizumab
Palivizumab
Heparina

FIG. 5

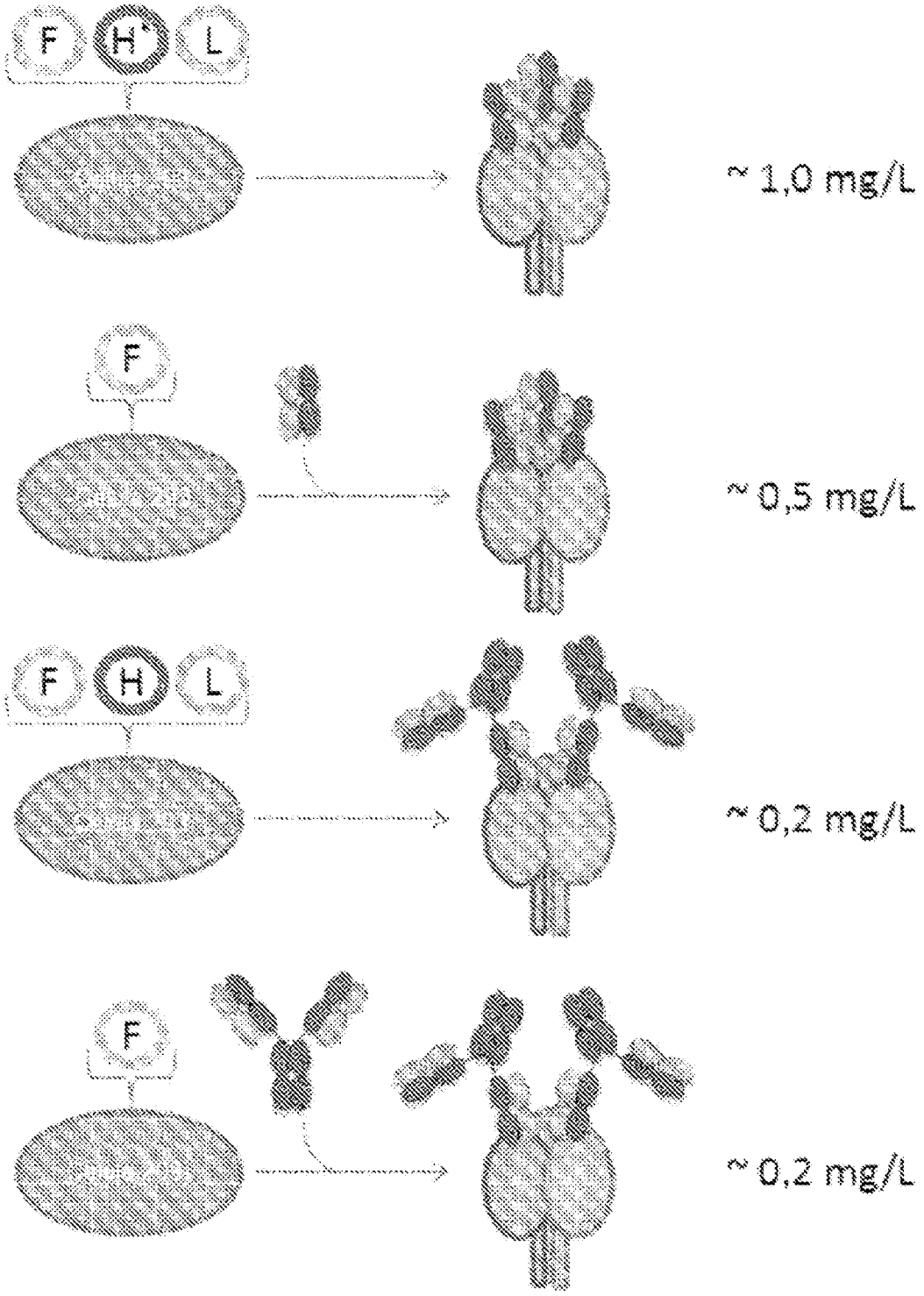


FIG. 6

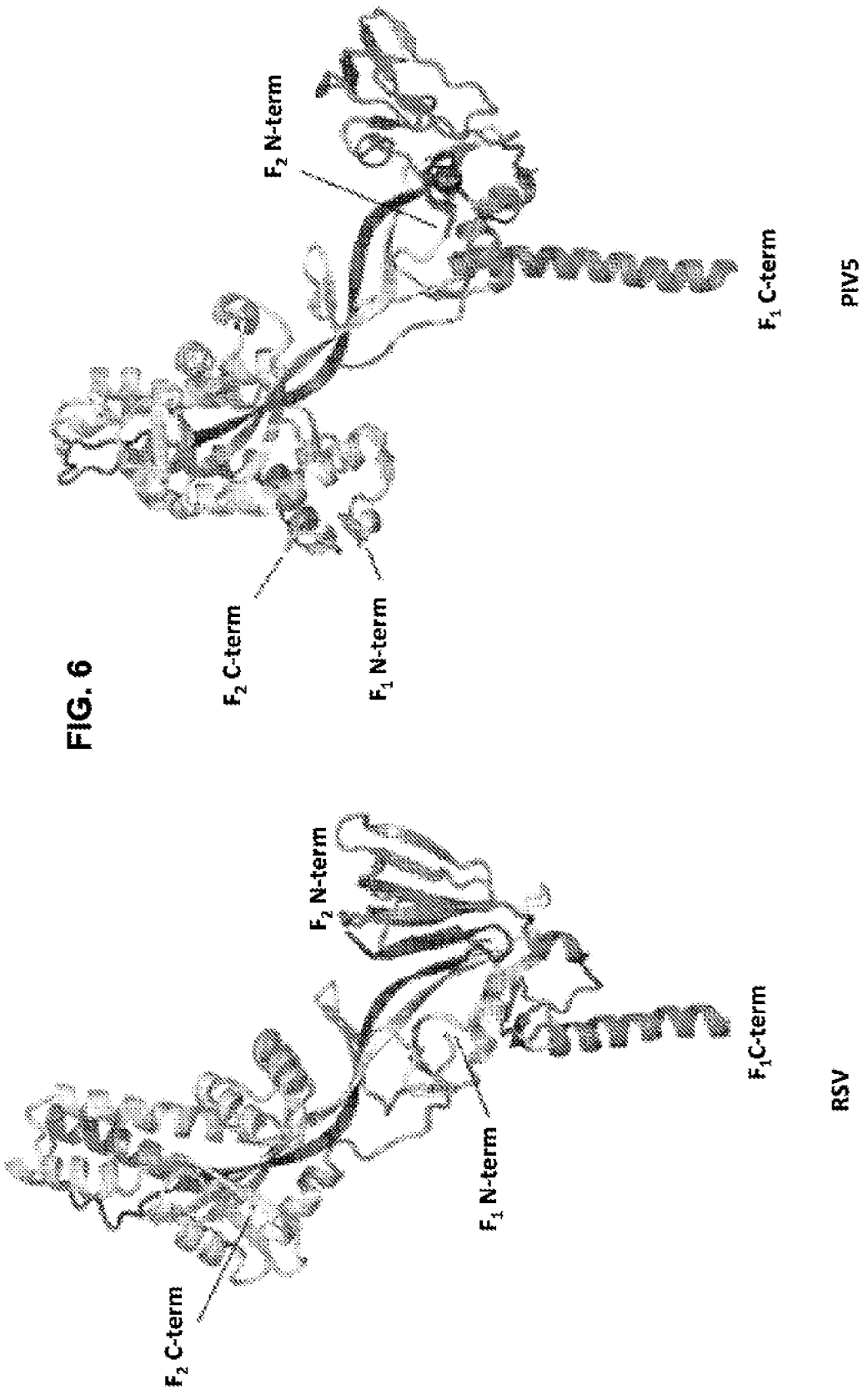

F2 N-term
F2 C-term
F1 N-term
F1 C-term
PIV5
F2 N-term
F2 C-term
F1 N-term
F1C-term
RSV

FIG. 7

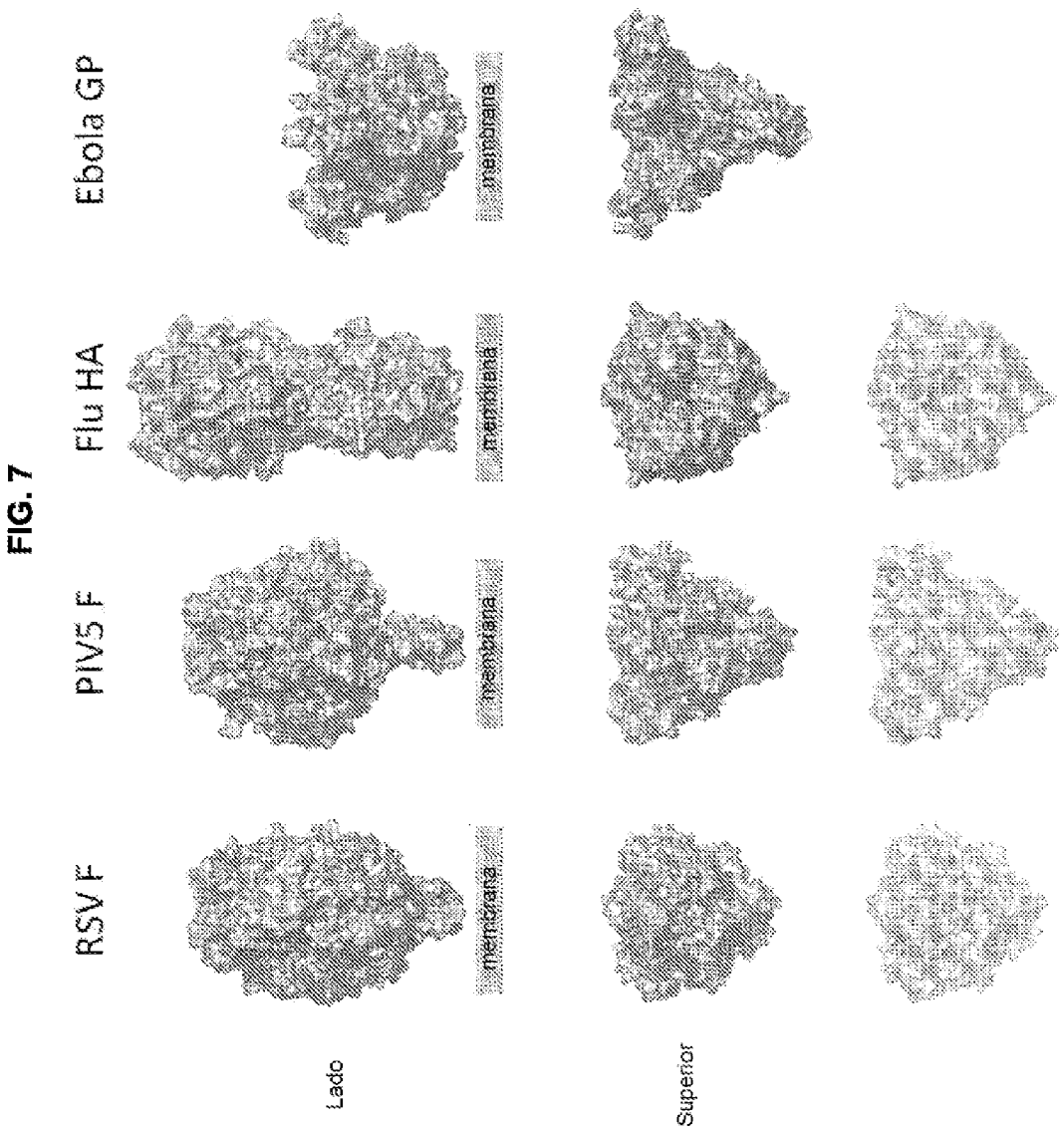


FIG. 8

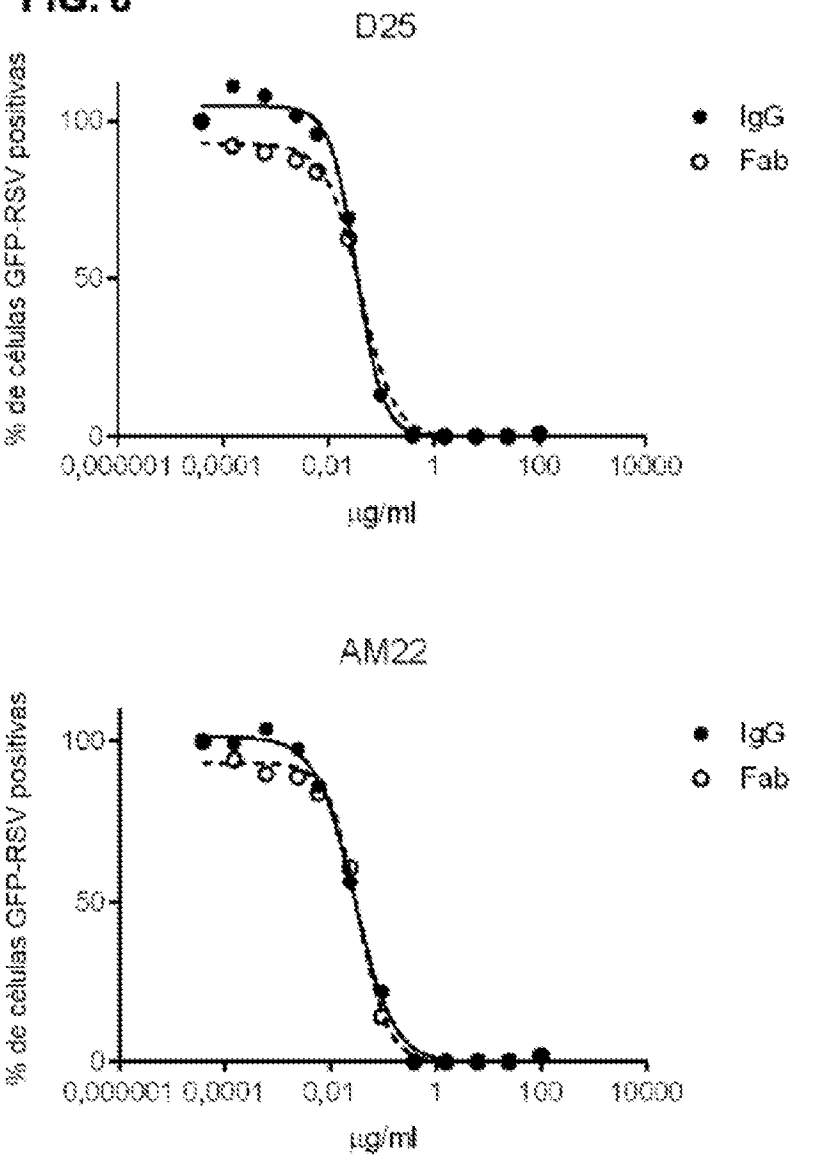

D25
% de células GFP-RSV positivas
100
50
0
0,000001 0,0001 0,01 1 100 10000
µg/ml
IgG
Fab
AM22
% de células GFP-RSV positivas
100
50
0
0,000001 0,0001 0,01 1 100 10000
µg/ml
IgG
Fab
Motavizumab
% de células GFP-RSV positivas
100
50
0
0,001 0,01 0,1 1 10 100 1000
µg/ml
IgG
Fab

FIG. 9A

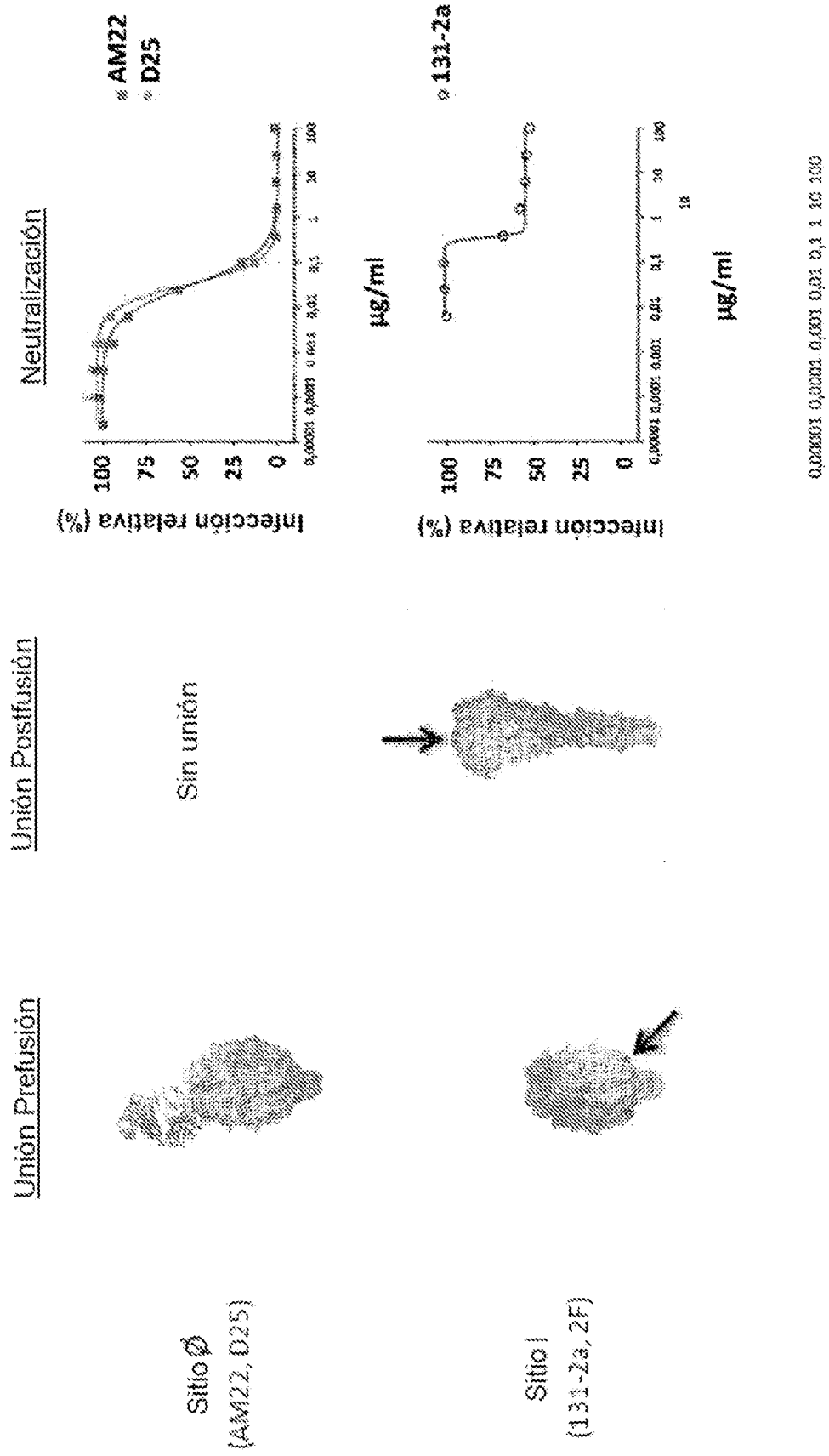

Unión Prefusión
Unión Postfusión
Neutralización
Sin unión
Sitio Ø
(AM22, D25)
Sitio I
(131-2a, 2F)
AM22
D25
131-2a
Infección relativa (%)
100
75
50
25
0
µg/ml

FIG. 9B

Unión Prefusión
Unión Postfusión
Neutralización
Motavizumab
Palivizumab
101F
Sitio II
(motavizumab)
(palivizumab)
Sitio IV
(101F, mAb19)
Infección relativa (%)
100
75
50
25
0
µg/ml

FIG. 10

La Mutación Ser166Cys/Ser290Cys Puede Formar un Enlace Disulfuro Solo en Estado de Prefusión

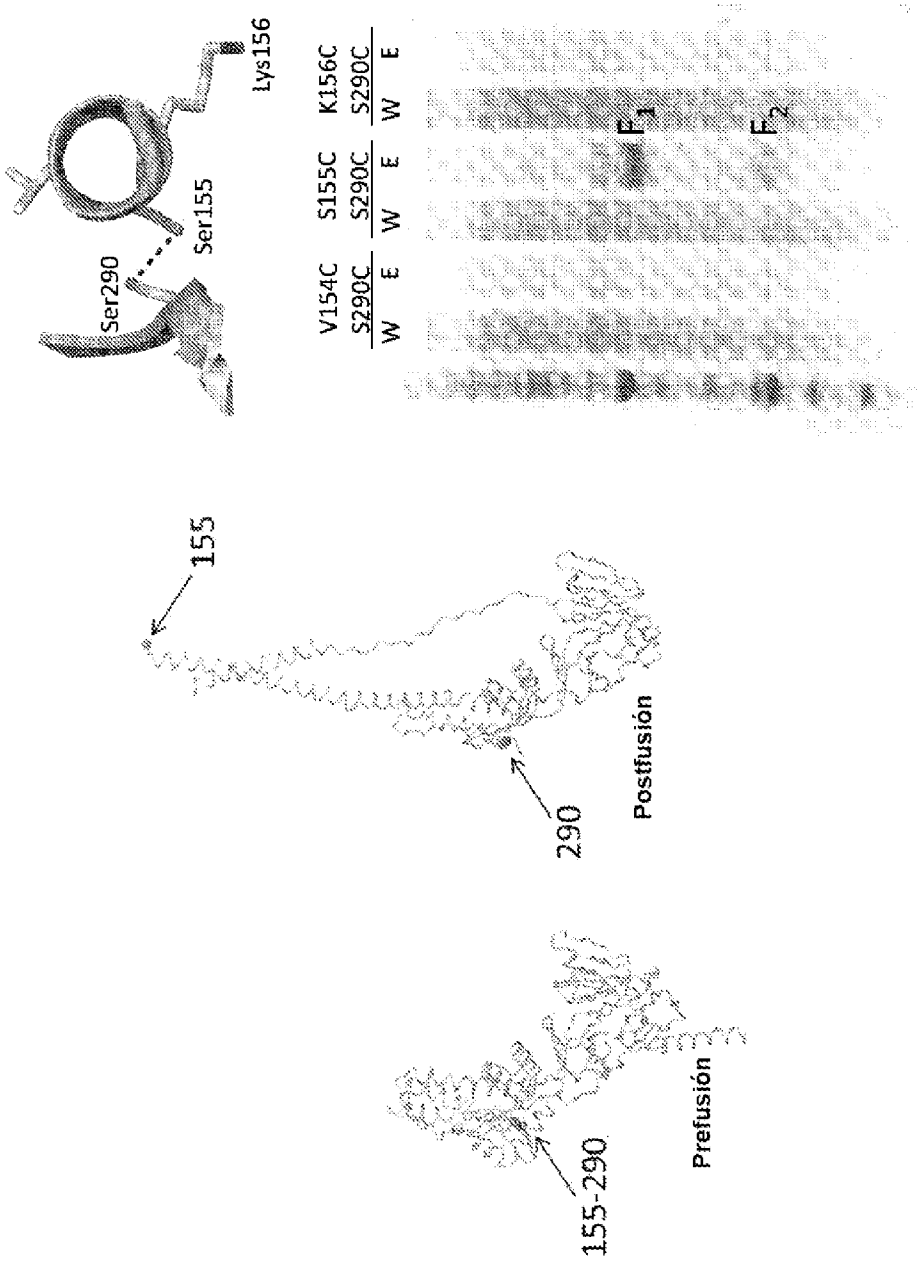


FIG. 11

Ser155Cys/Ser290Cys Estabiliza la Conformación de Prefusión de F de RSV

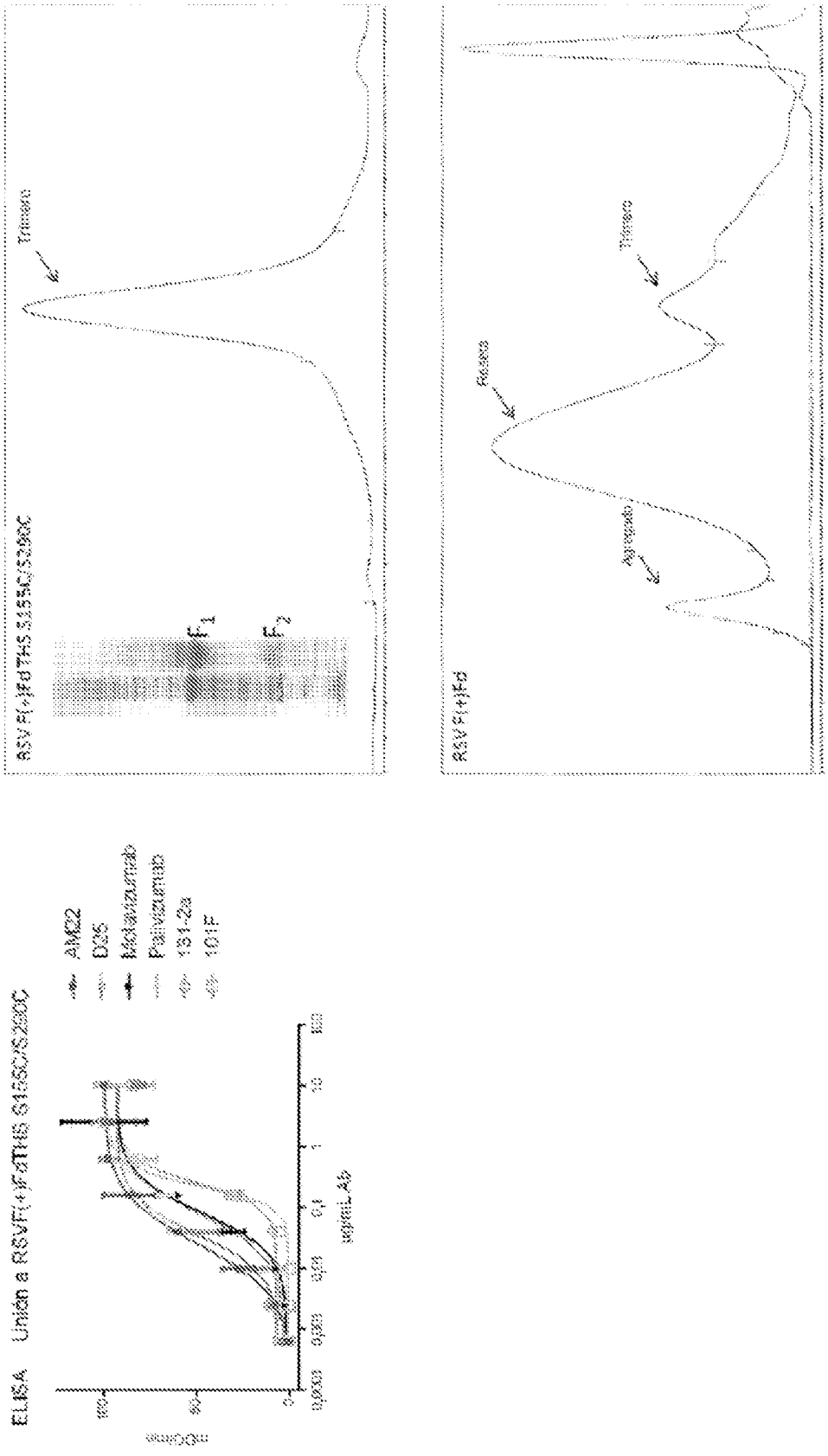


FIG. 12

Ser155Cys/Ser290Cys Resulta en F de RSV Estabilizada en Prefusión Homogénea

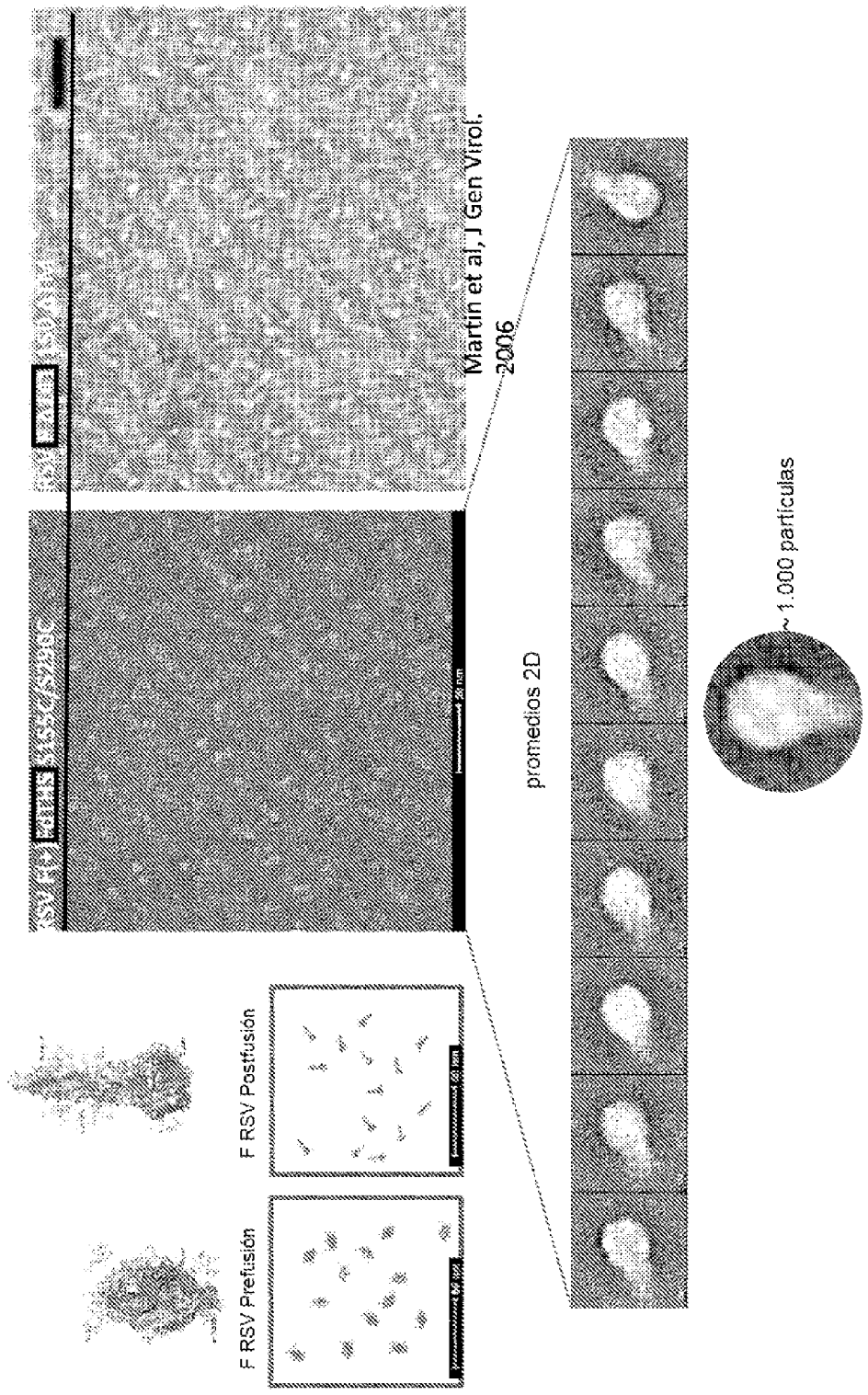
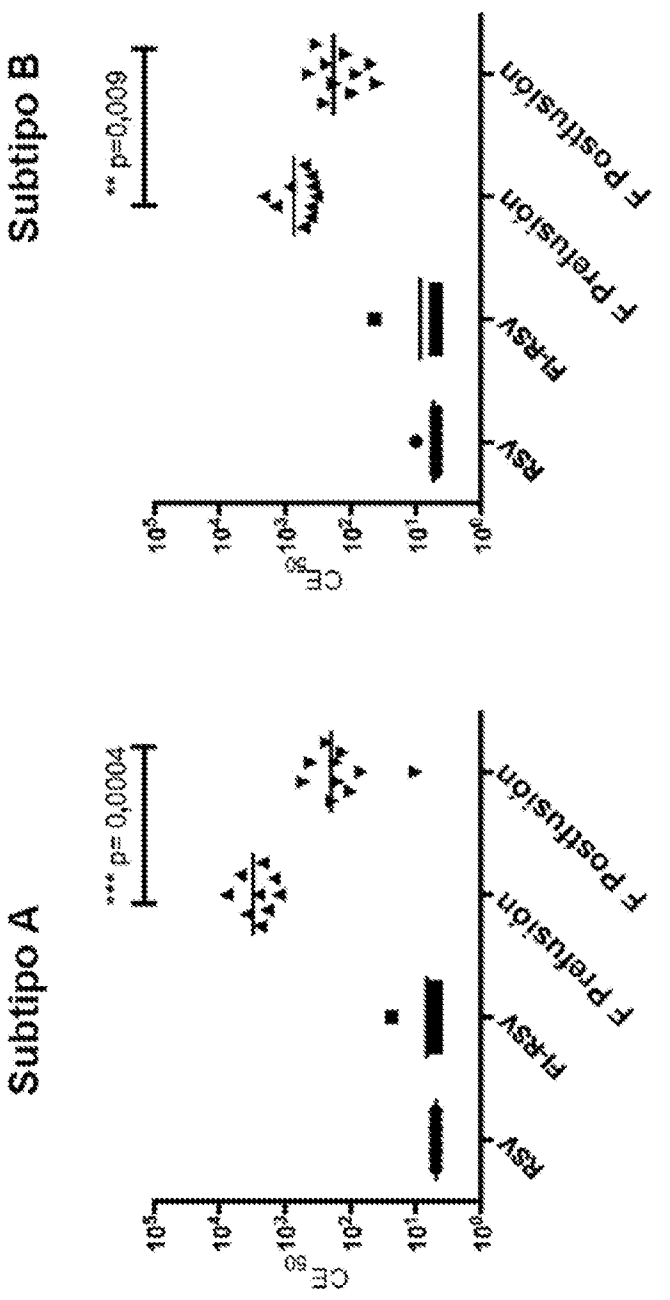


FIG. 13

Neutralización de RSV subtipos A y B
Semana 5



RSV Línea 19 (Subtipo A)

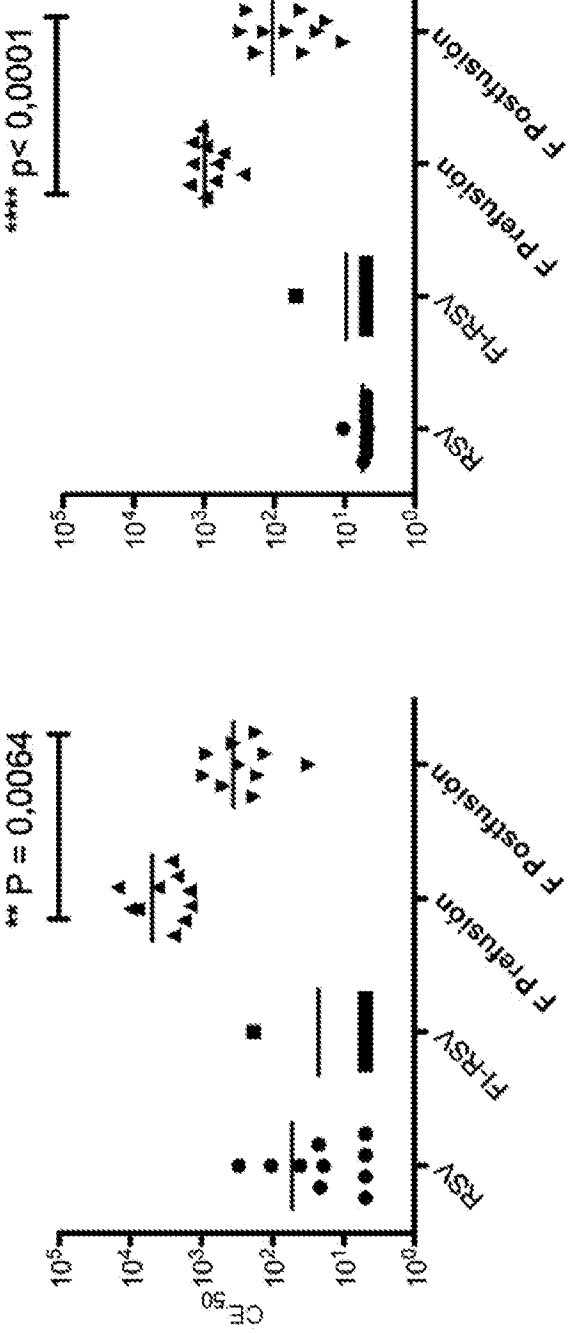
	RSV	FI-RSV	F pre-fusión	F post-fusión
Media	0	7	3143	198

RSV 18537 (Subtipo B)

	RSV	FI-RSV	F pre-fusión	F post-fusión
	0	0	1063	260

FIG. 14

Neutralización de RSV subtipos A y B
semana 7



RSV Línea 19 (Subtipo A)

	RSV	FI-RSV	pre-fusión F	post-fusión F
Media	51	18	4930	360

RSV 18537 (Subtipo B)

	RSV	FI-RSV	pre-fusión F	post-fusión F
	2	5	971	108

FIG. 15

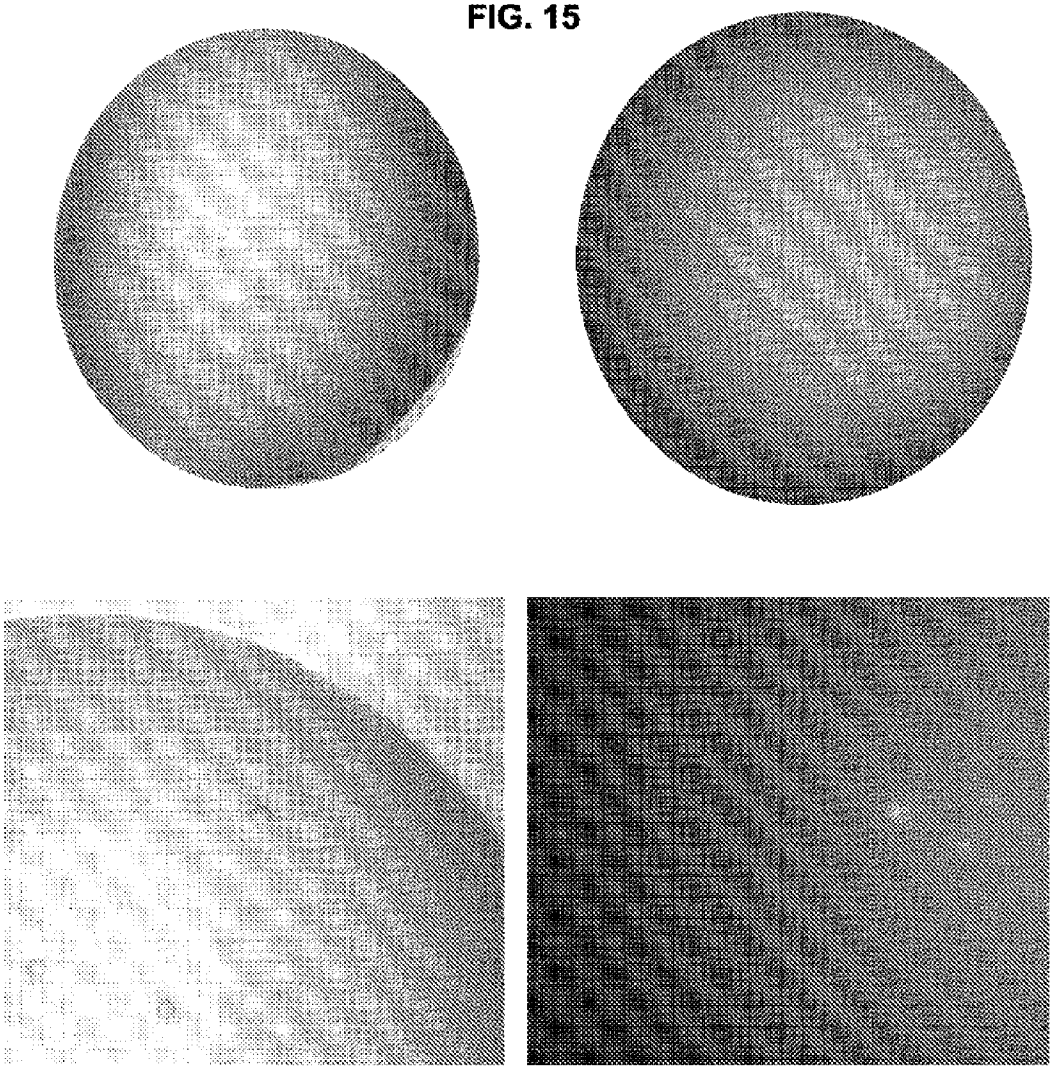


FIG. 16

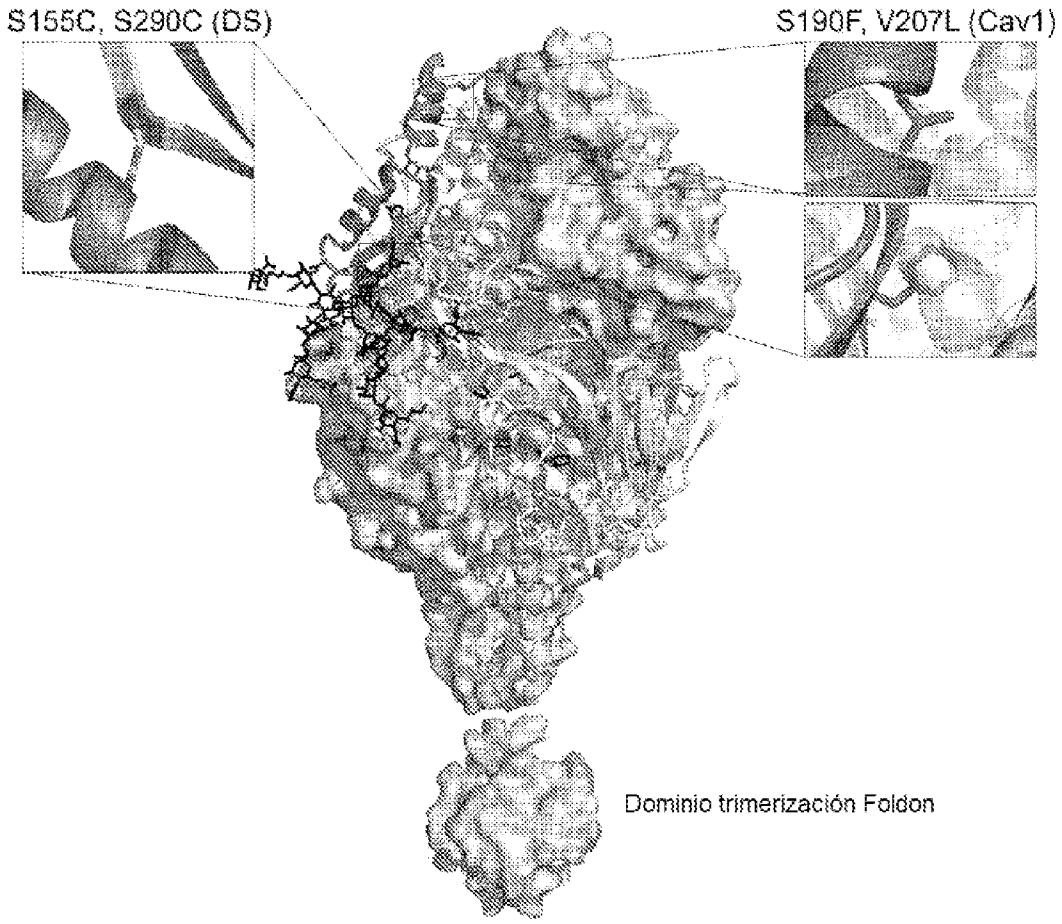
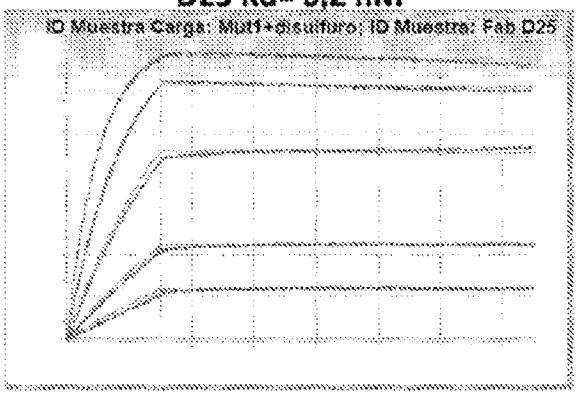
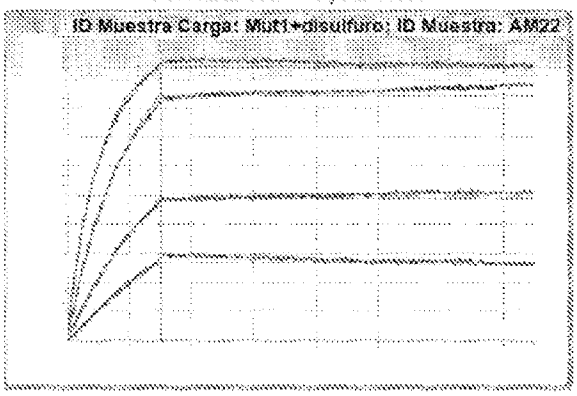

S155C, S290C (DS)
S190F, V207L (Cav1)
Dominio trimerización Foldon

FIG. 17

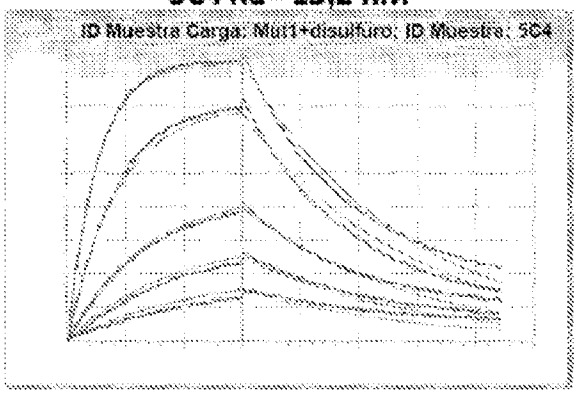
D25 Kd= 0,2 nM



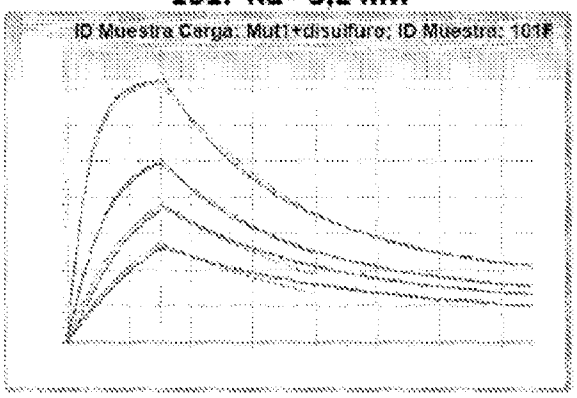
AM22 Kd< 0,01 nM



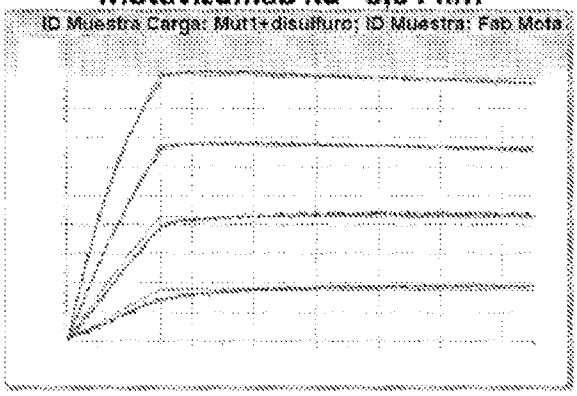
5C4 Kd= 13,2 nM



101F Kd= 3,2 nM



Motavizumab Kd= 0,04 nM



Palivizumab Kd= 23,4 nM

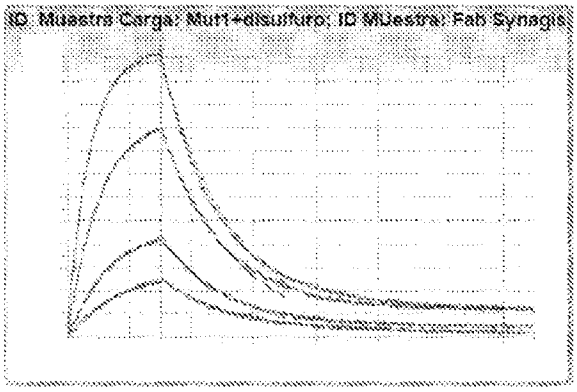


FIG. 18

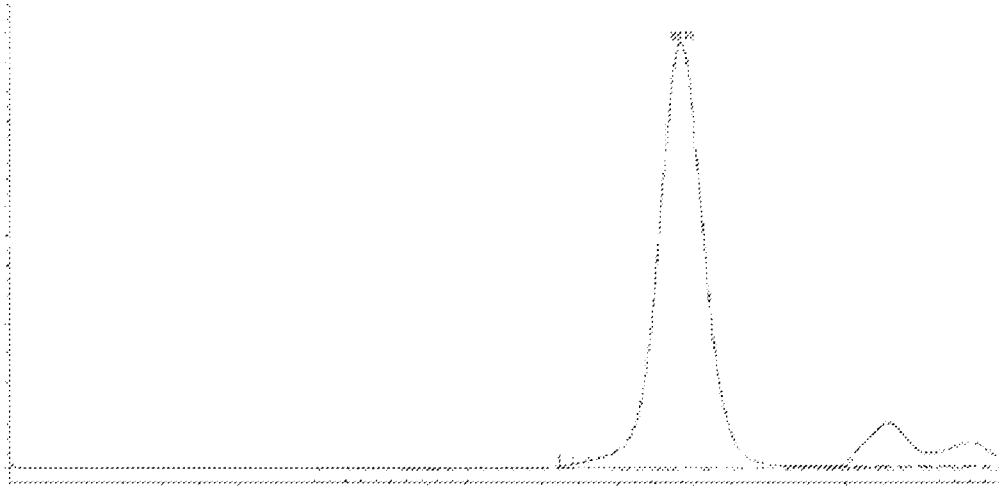


FIG. 19

Variante F RSV	Rendimiento (mg/L)*	Valor anticuerpo K_D (nM)							Caracterización física (reactividad fraccionada D35)							
		Sitio Ø			Sitio I	Sitio II		Sitio IV	Temp (°)			pH		Osmolalidad (mM)		Congelación-Descongelación
		D25	AM22	5C4	131-2a	Paliv	Mota	101F	58	70	90	3,5	10,0	10	3000	
S155C, S290C (DS)	1,4	0,3	<0,01	35,4	3,4	2,8	0,04	2,2	0,3	0	0	0,1	0,8	1,3	0,8	0,3
S190F, V207L (Cav1)	2,2	0,23	<0,10	9,31	>1000	42,00	<0,01	2,94	0,8	0,1	0,1	0,7	0,8	1,0	0,7	0,6
DSCav1	1,9	0,2	<0,01	13,2	>1000	33,4	0,04	3,2	0,9	0	0	0,8	0,9	1,0	0,8	0,7

* El rendimiento se muestra para la fracción trimérica
> 1000 nM = ninguna unión a concentración de Fab de 1 µM

FIG. 20

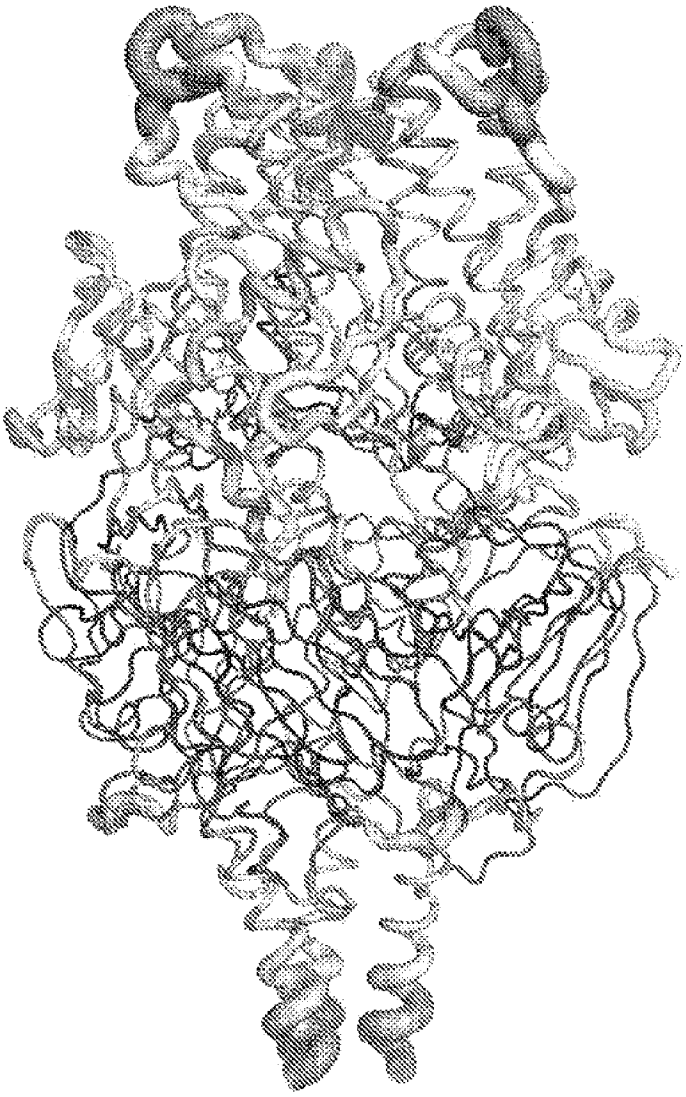


FIG. 21

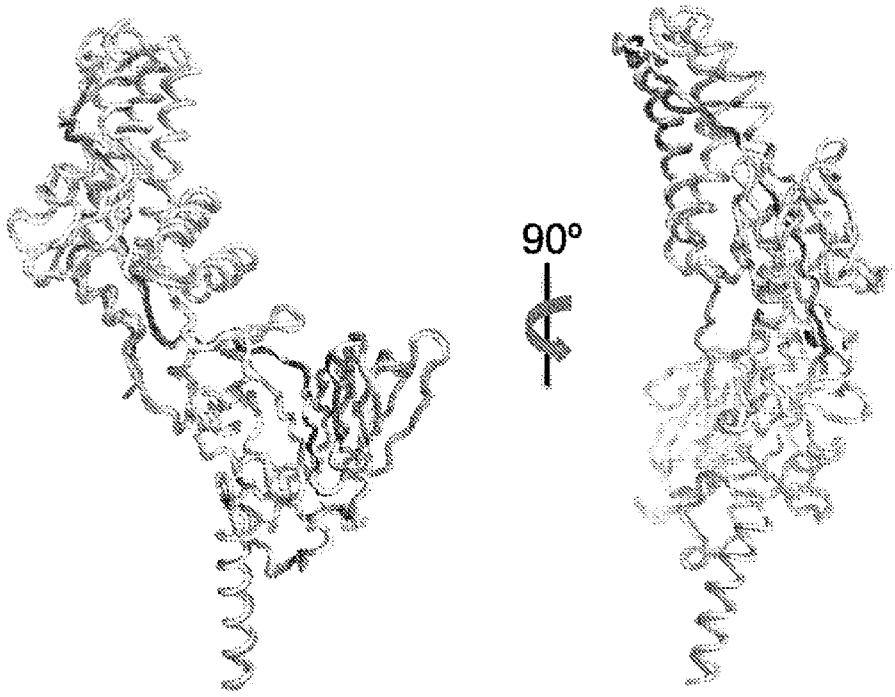


FIG. 22

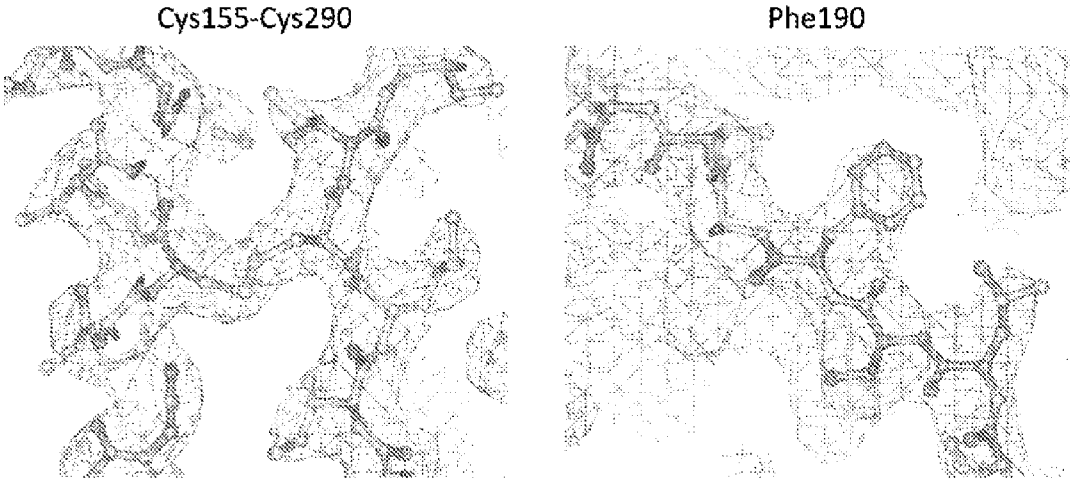


FIG. 23

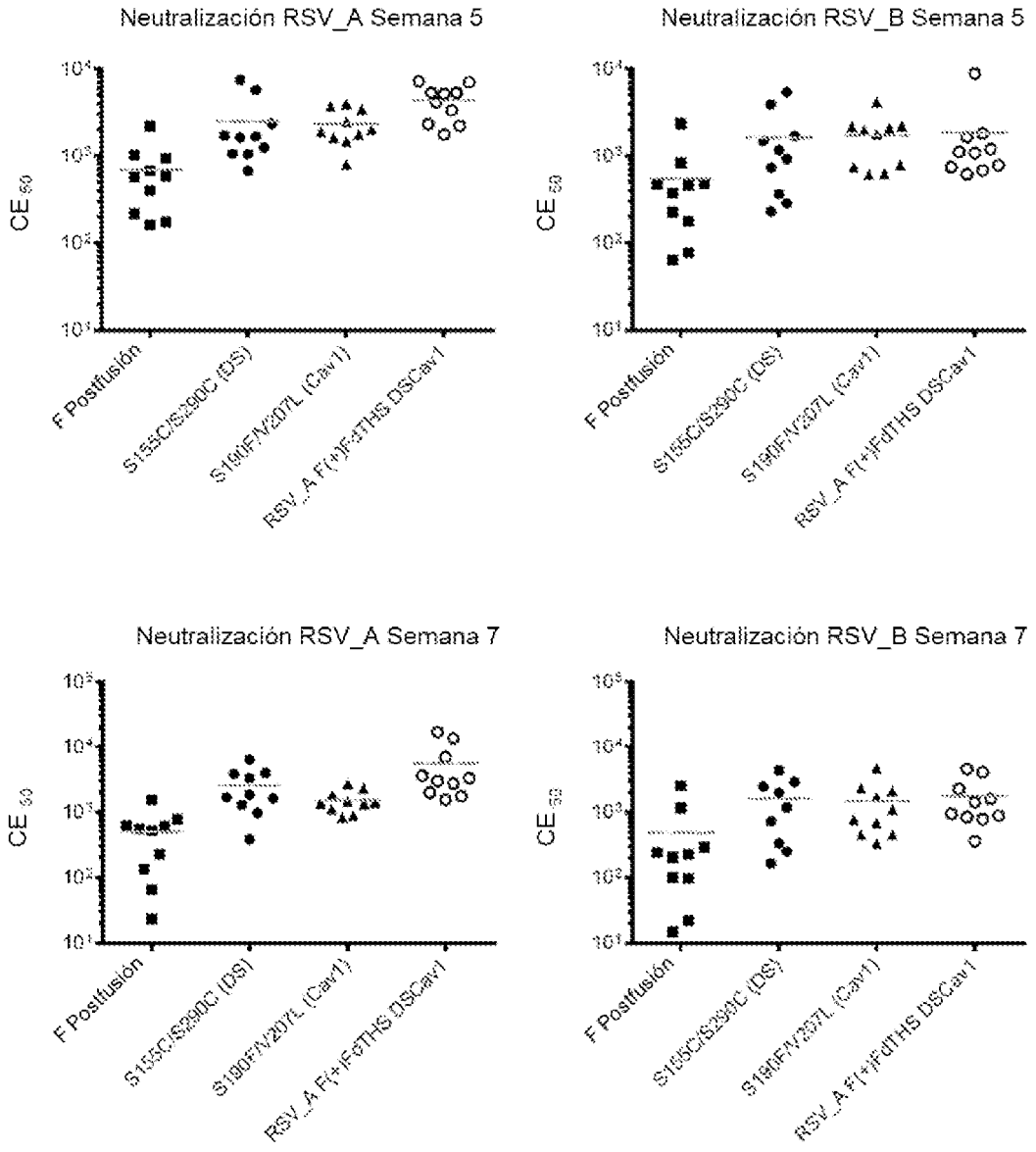

Neutralización RSV_A Semana 5
Neutralización RSV_B Semana 5
Neutralización RSV_A Semana 7
Neutralización RSV_B Semana 7
CE50
F Postfusión
S155C/S290C (DS)
S190F/V207L (Cav1)
RSV_A F(+)F3THS DSCav1

FIG. 24

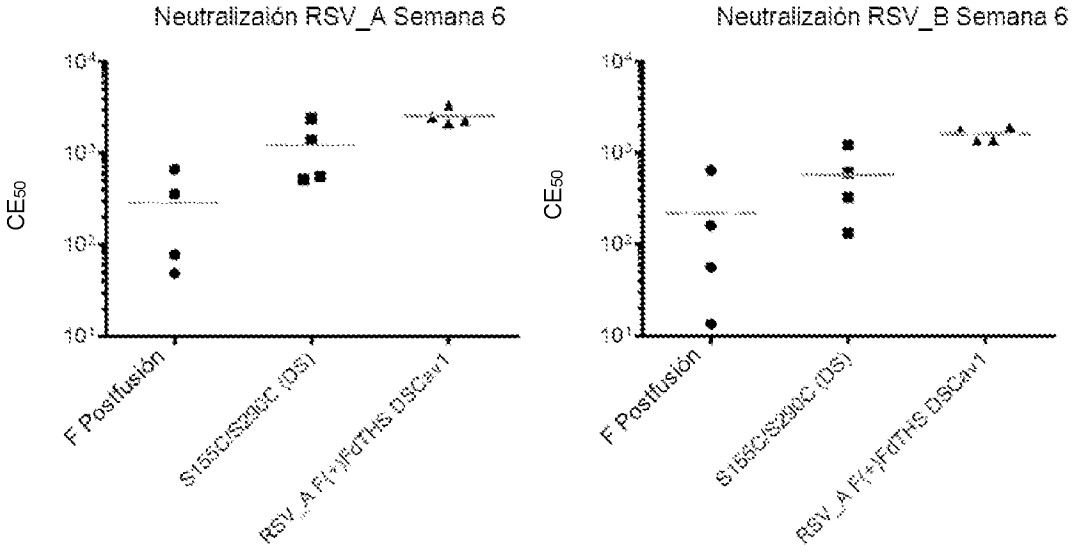


FIG. 25A

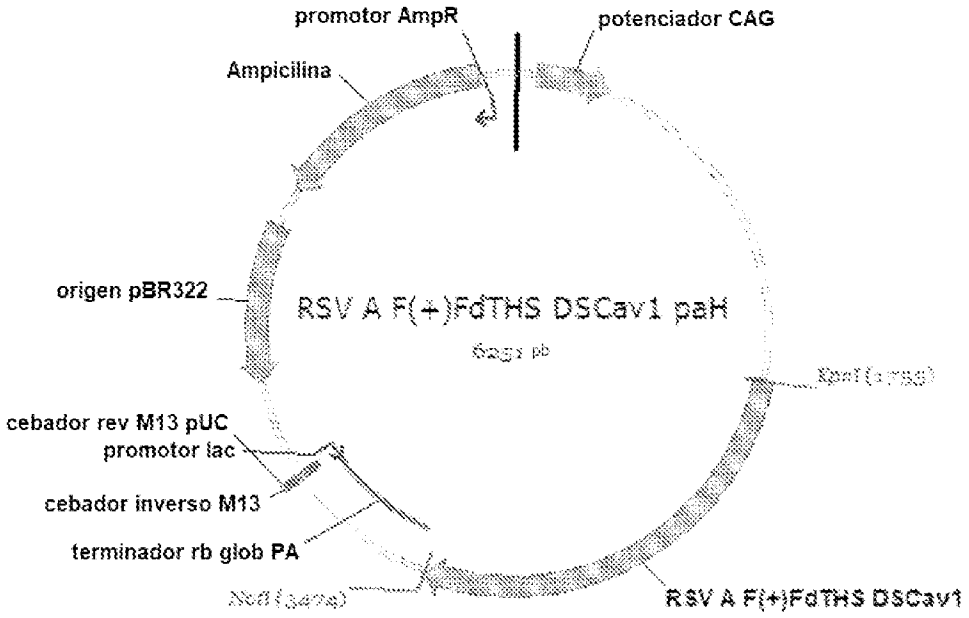


FIG. 25B

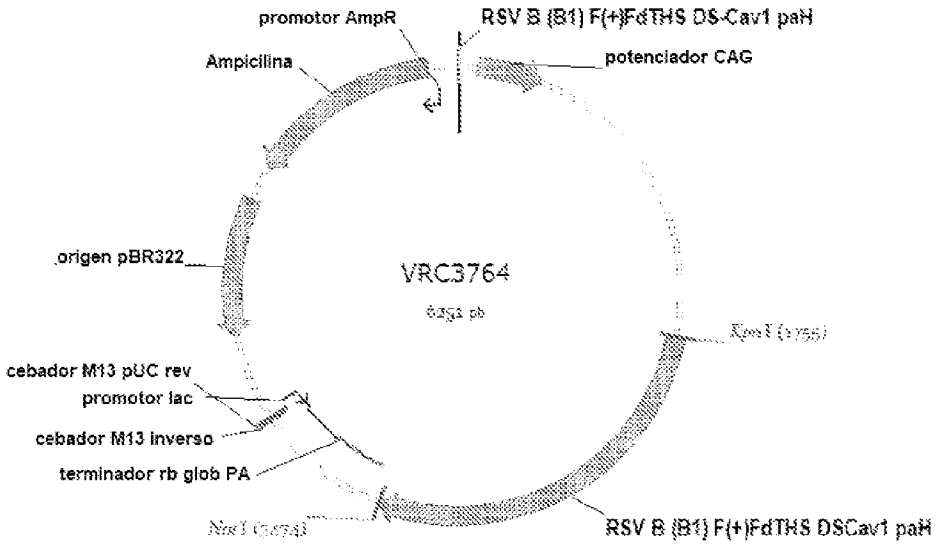


FIG. 25C

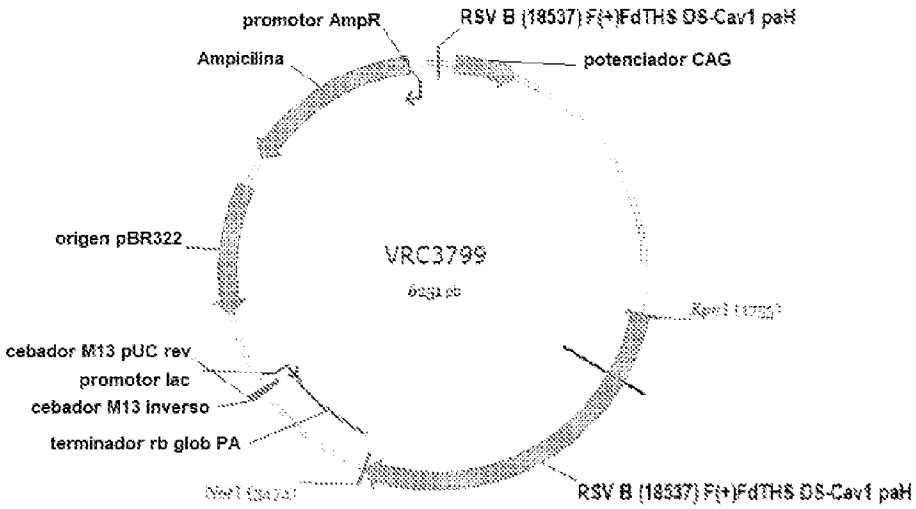


FIG. 26A

Caracterización de respuestas protectoras inducidas por infección natural

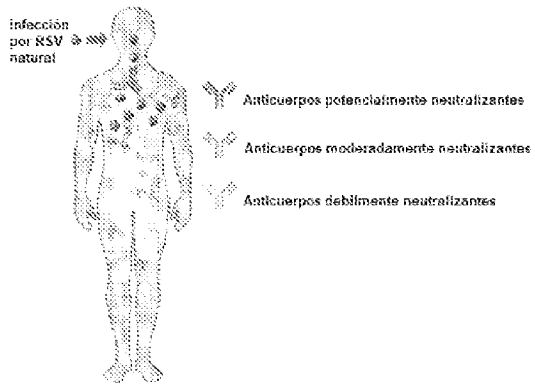
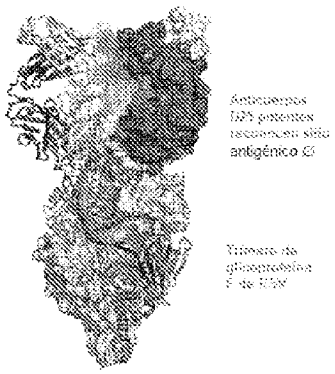


FIG. 26B

Definición estructural de un supersitio de vulnerabilidad viral



Matriz de información para diseño de vacuna basado en estructura

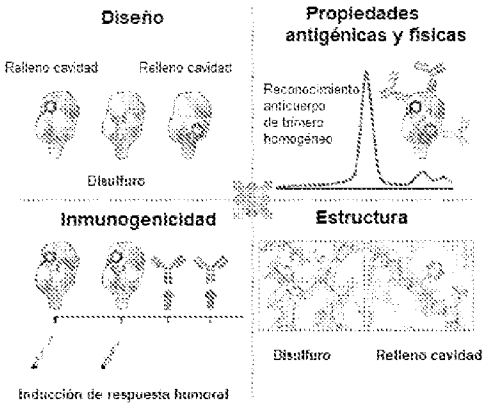


FIG. 26C

Inducción de respuestas protectoras con un inmunógeno del supersitio

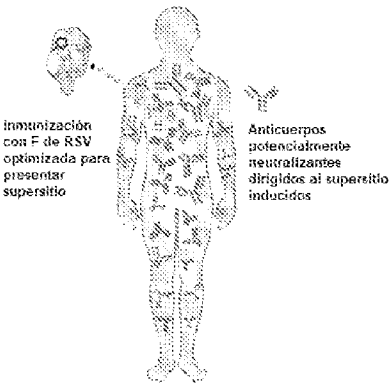
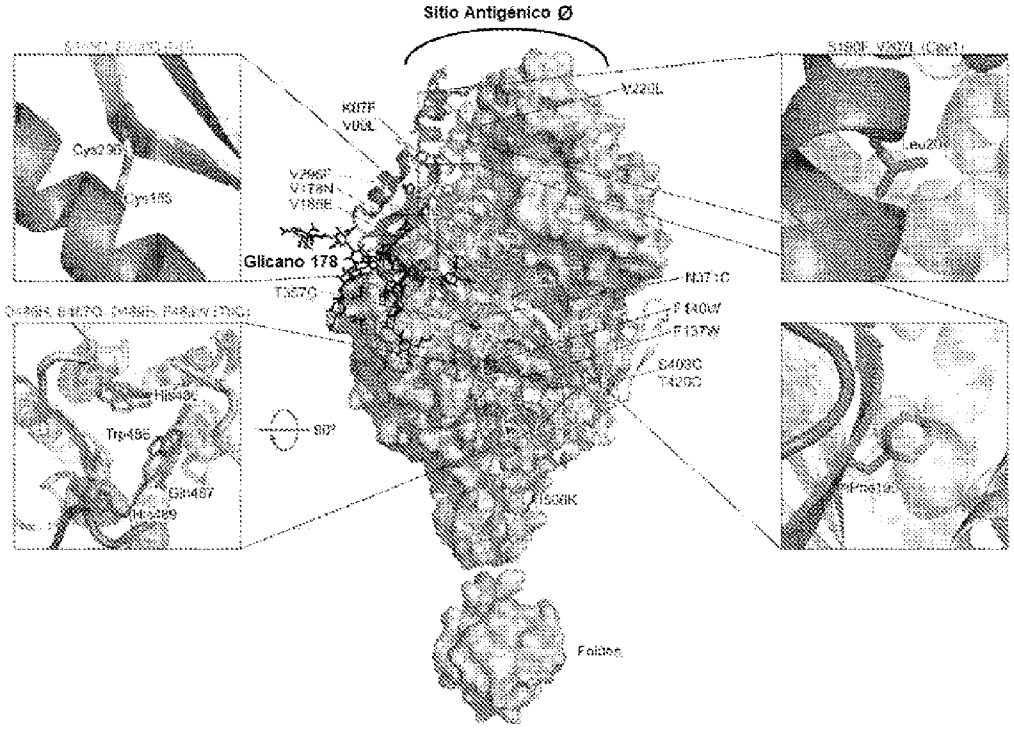


FIG. 26D

FIG. 27


Sitio Antigénico Ø
Glicano 178
Cys296
Cys445
His438
Trp486
Gly487
His289
Ser375
Thr376
Phe515
Leu517

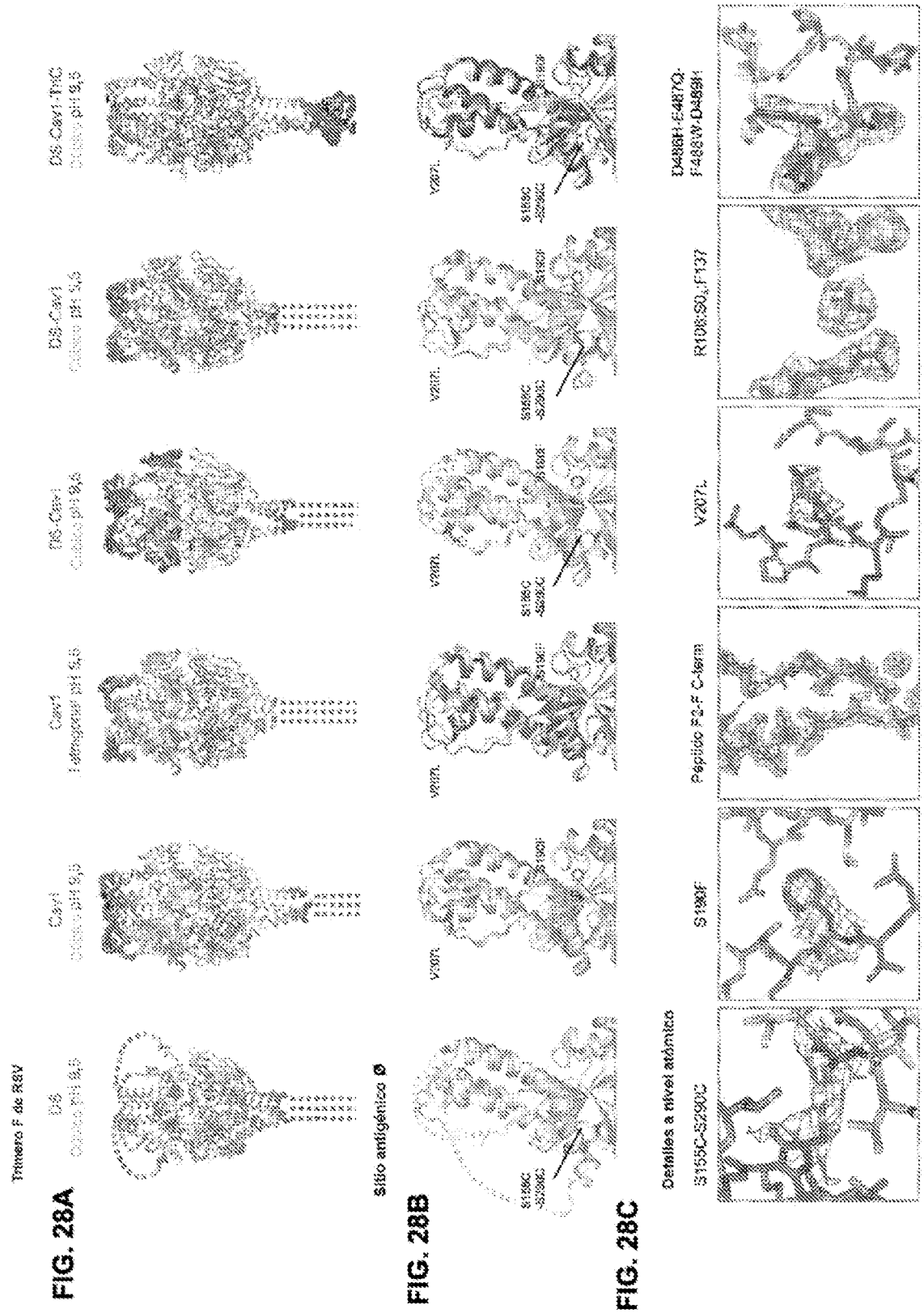


FIG. 28A

FIG. 28B

FIG. 28C

FIG. 29A

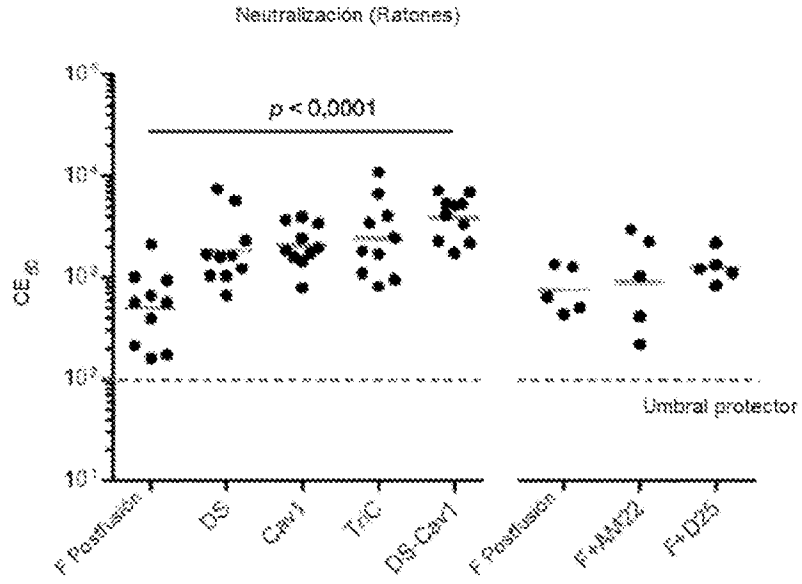


FIG. 29B

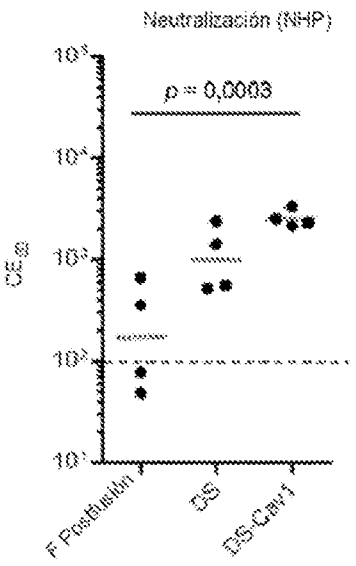


FIG. 30A

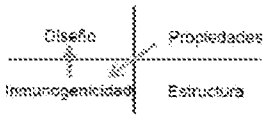
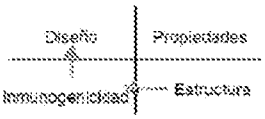
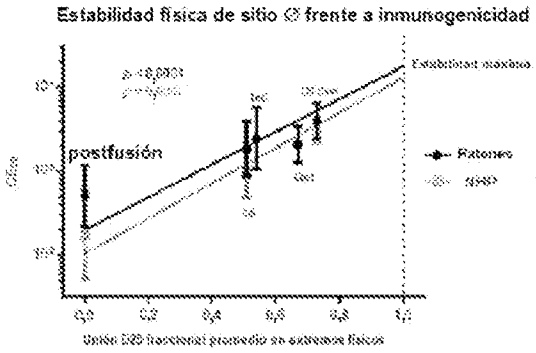
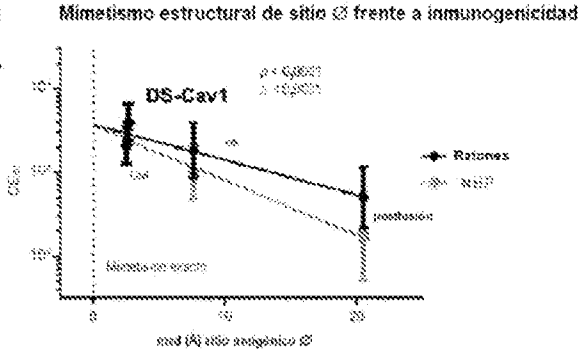


FIG. 30B







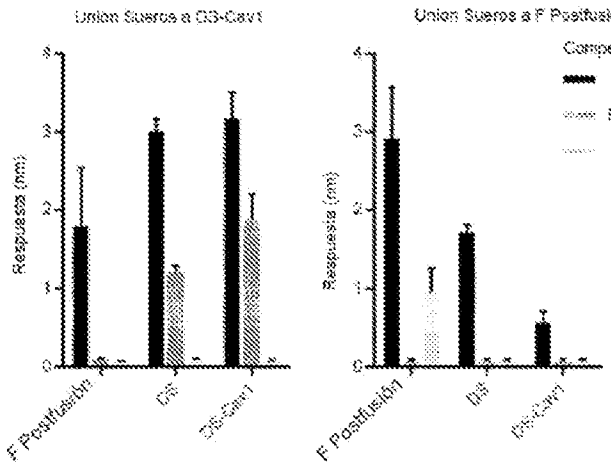


FIG. 30C

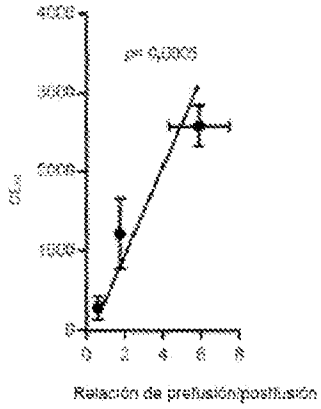


FIG. 30D

FIG. 31A

Variante F de RSV	Estado oligomérico c)	Rendimiento (mg/L)*	Valor aparente Kd (nM)						
			Sitio Ø			Sitio I	Sitio II		Sitio IV
			D25	AM22	5C4	131-2a	Paliv	Mota	101 F
K67F, V90L	Agregado	0,3	>1000	>1000	>1000	7,8	1,88	0,17	1,57
F137W, F140W	N.D.	<0,1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F137W, F140W, F488W	N.D.	<0,1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S190C, S269C (DS)	Trímero	1,4	0,3	<0,01	35,4	3,4	2,8	0,04	2,2
V175N	Agregado	<0,1	>1000	>1000	>1000	7,16	3,13	0,11	1,84
V180E	Agregado	<0,1	>1000	>1000	>1000	8,89	1,70	0,11	1,84
S190F, V207L (Cav1)	Trímero	3,2	0,23	<0,01	8,31	>1000	42,60	<0,01	2,84
S190F, V296F (Cav2)	Agregado	0,4	>1000	>1000	>1000	4,17	1,87	<0,01	1,59
V207L, V220L (Cav3)	Agregado	0,4	>1000	>1000	>1000	2,79	0,98	0,01	0,69
T267C, S271C	N.D.	<0,1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S403C, T428C	Agregado	0,3	>1000	>1000	>1000	3,08	3,31	0,05	1,85
D486N, E487Q, D489N	Agregado	0,1	>1000	>1000	>1000	>1000	6,5	0,57	12,7
D486N, E487Q, D489N, F488W (TriC)	Trímero	0,8	0,01	1,5	33,6	>1000	30,7	0,5	4,0
F488W	Trímero	1,7	0,09	0,25	26,88	>1000	31,6	0,1	4,74
I505K	Agregado	<0,1	>1000	>1000	>1000	4,55	1,71	0,05	1,38
DoMMa									
DS, Cav1	Trímero	1,5	0,2	<0,01	13,2	>1000	23,4	0,04	3,2
DS, TriC	Trímero	0,8	0,17	<0,01	33		4,8	0,05	3,1
Cav1, TriC	Trímero	0,2	0,09	0,085	5,1	>1000	32,28	0,17	3,09
DoMo									
DS, Cav1, TriC	Trímero	1,3	0,17	0,02	17,8	>1000	18,72	0,19	3,17

FIG. 31B

Variante F de RSV	Caracterización física (reactividad D25 fraccionada)							
	Temp (°)			pH		Osmolalidad (mM)		Cong.-Des-cong.
	50	70	90	3,5	10,0	10	3000	10x
K67F, V90L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F137W, F140W	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F137W, F140W, F488W	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S155C, S290C (DS)	0,3	0	0	0,1	0,3	1,3	0,8	0,3
V178N	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
V185E	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S190F, V207L (Cav1)	0,8	0,1	0,1	0,7	0,8	1,0	0,7	0,6
S190F, V296F (Cav2)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
V207L, V220L (Cav3)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
T357C, N371C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S403C, T420C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D486H, E487Q, D489H	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D486H, E487Q, D489H, F488W (TriC)	0,8	0,1	0,1	0,1	0,8	1,3	0,6	0,1
F488W	0,3	0,1	0	0,1	0,7	1,1	0,5	0
S306K	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Dobles								
DS, Cav1	0,3	0	0	0,2	0,3	1,0	0,8	0,7
DS, TriC	0,9	0	0	0,3	0,9	0,5	0,5	0,5
Cav1, TriC	0,9	0,1	0,1	0,3	0,8	0,6	0,5	0
Triple								
DS, Cav1, TriC	0,9	0,1	0,1	0,6	0,9	0,6	0,6	0

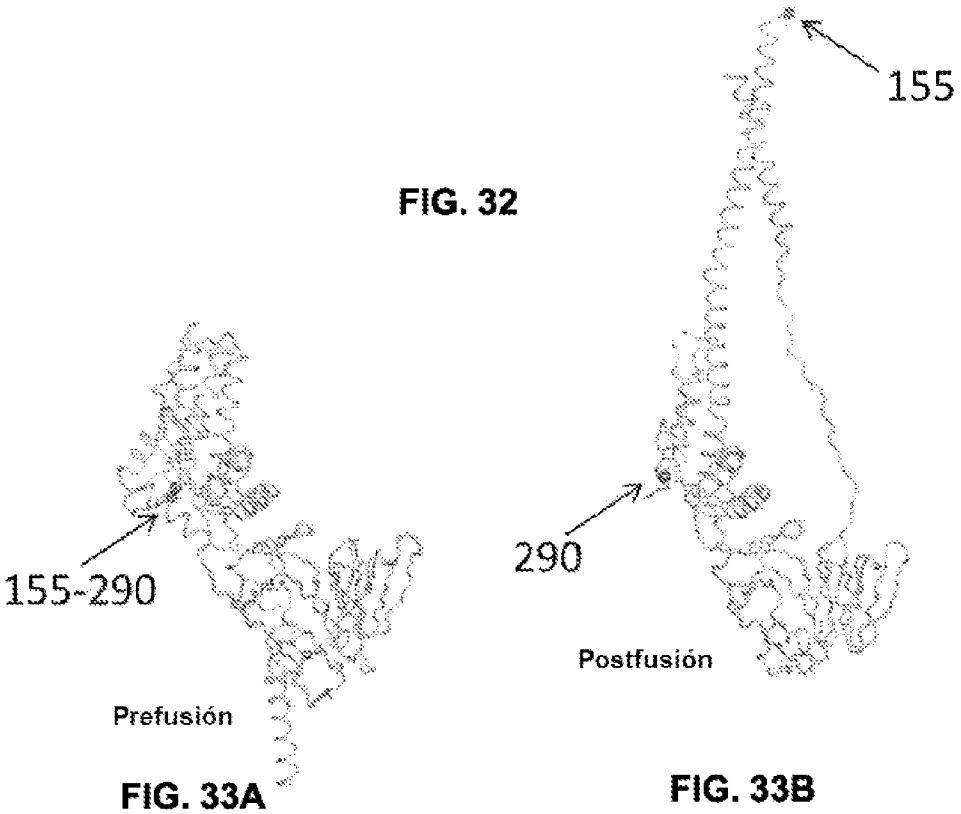


FIG. 32

FIG. 33A

FIG. 33B

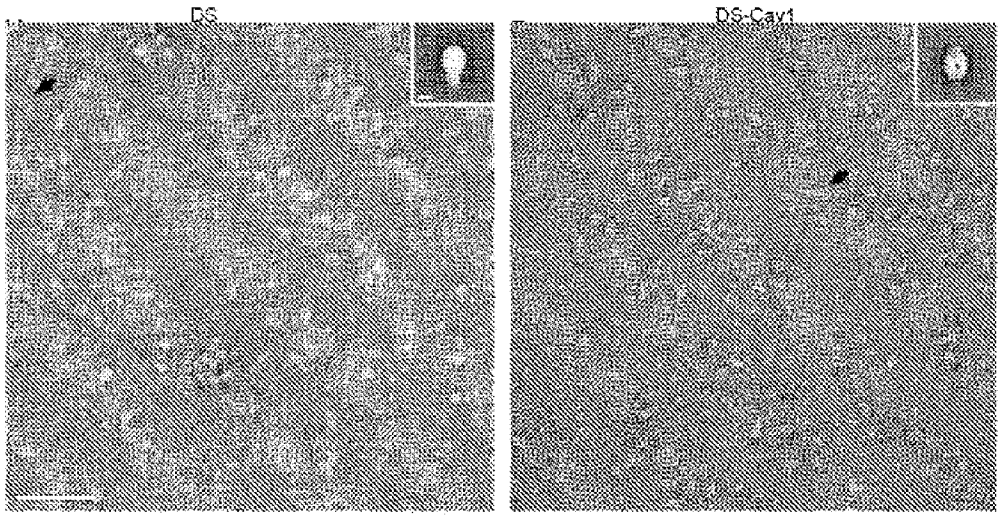


FIG. 33C

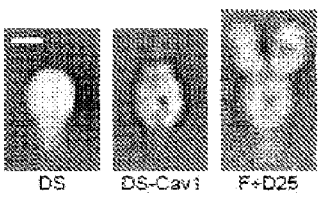


FIG. 34

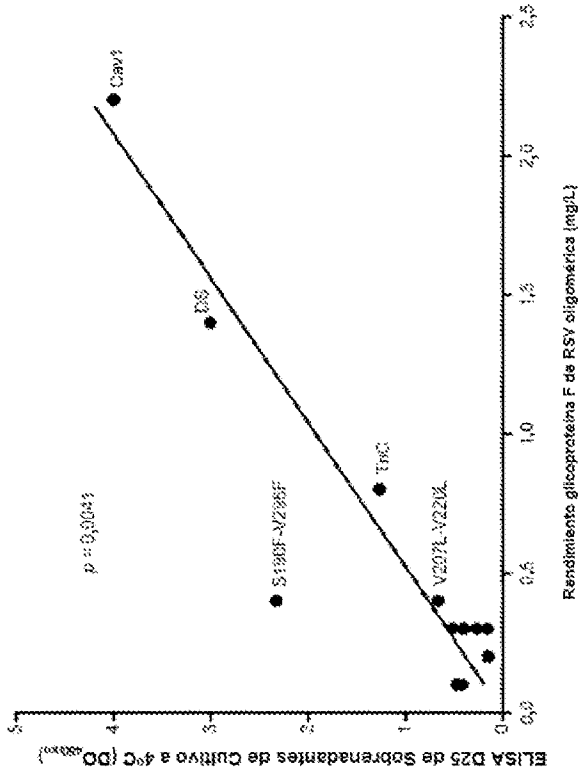
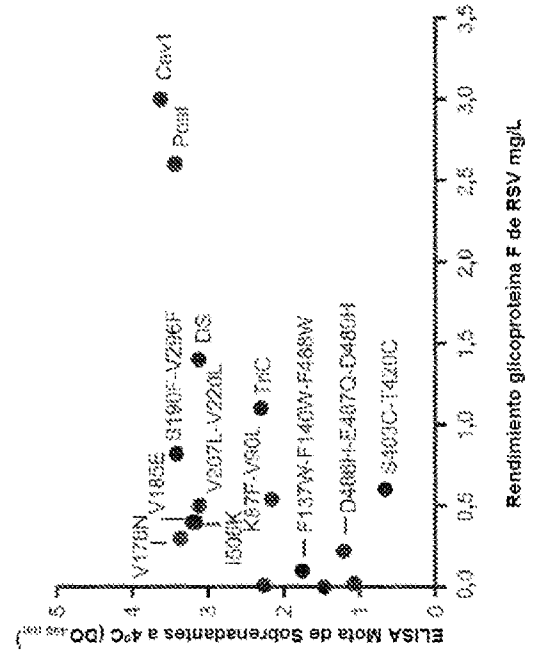


FIG. 35



ELISA Mota de Sobrenadantes a 4ºC (DO450nm)
Rendimiento glicoproteína F de RSV mg/L
F137W-F140W-F488W
V178N
I506K
S403C-T429C
TriC
DS
S190F-V296F
K87F-V90I
V207L-V220L
V185E
D488H-E487Q-D489H
Post
Cav1
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0

a = Cav1
b = Cav1-TriC
c = DS-Cav1-TriC
d = F488W
e = DS-Cav1
f = TriC
g = DS-TriC
h = DS
i = S190F-V296F
j = K87F-V90L
k = V207L-V220L
l = V178N
m = S403C-T420C
n = I506K
o = V185E
p = F137W-F140W- F488W
q = D486H-E487Q-D489H

FIG. 36

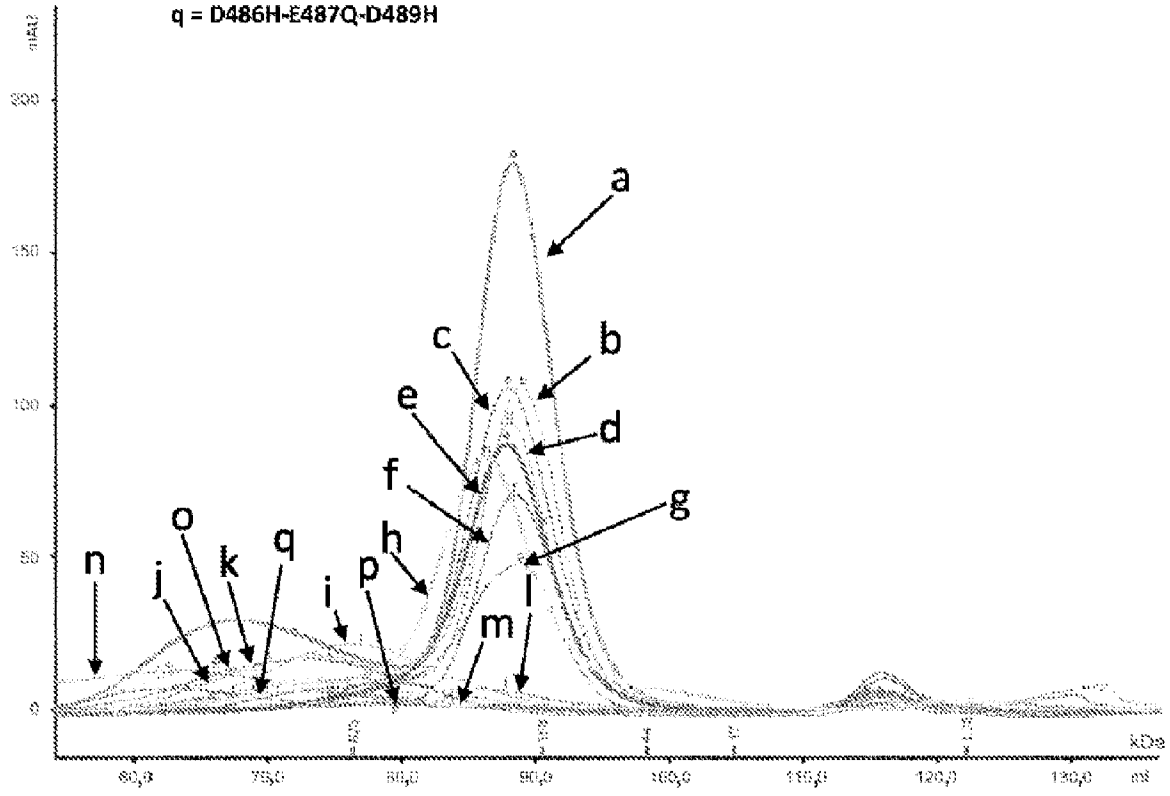


FIG. 37

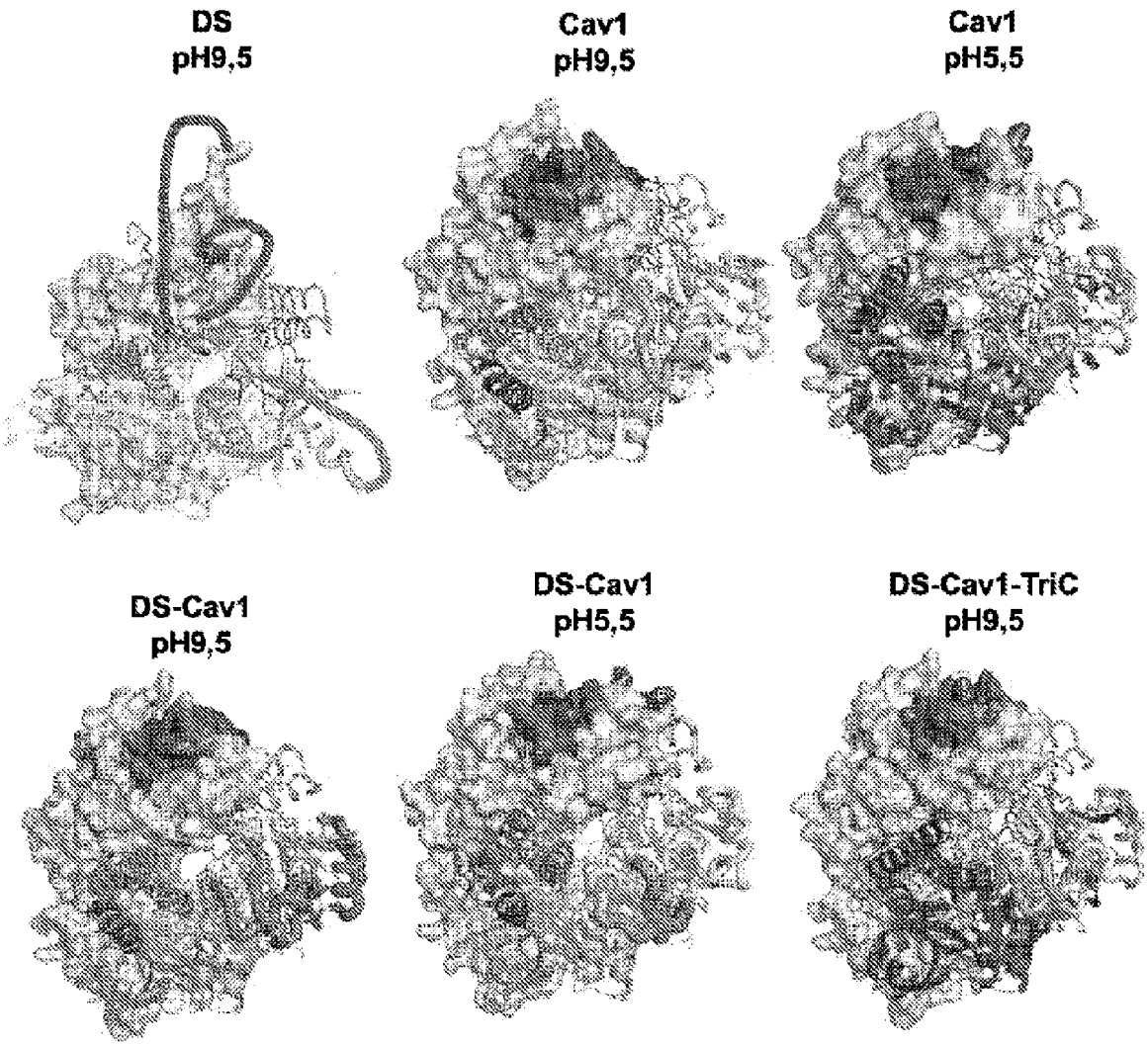

DS
pH9,5
Cav1
pH9,5
Cav1
pH5,5
DS-Cav1
pH9,5
DS-Cav1
pH5,5
DS-Cav1-TriC
pH9,5

FIG. 38A

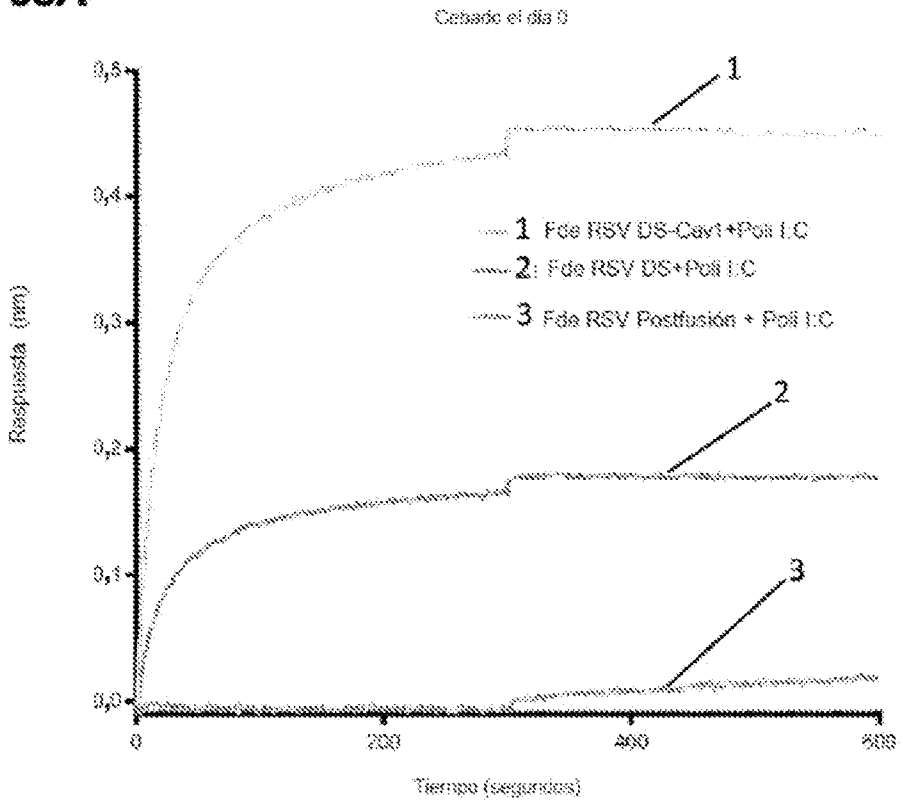


FIG. 38B

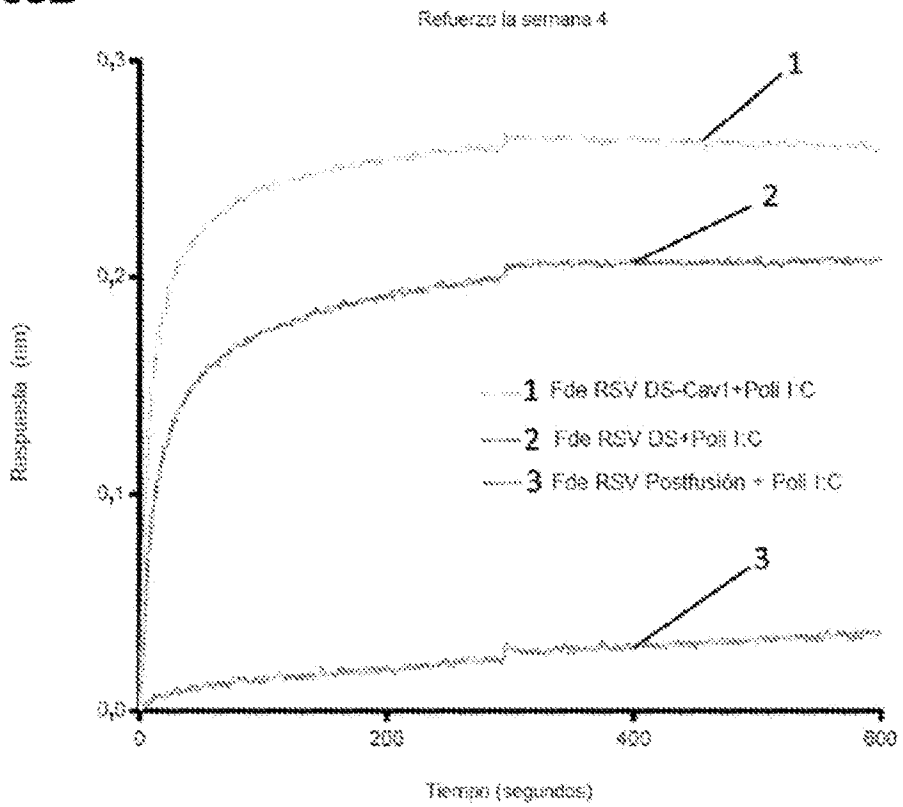


FIG. 39A

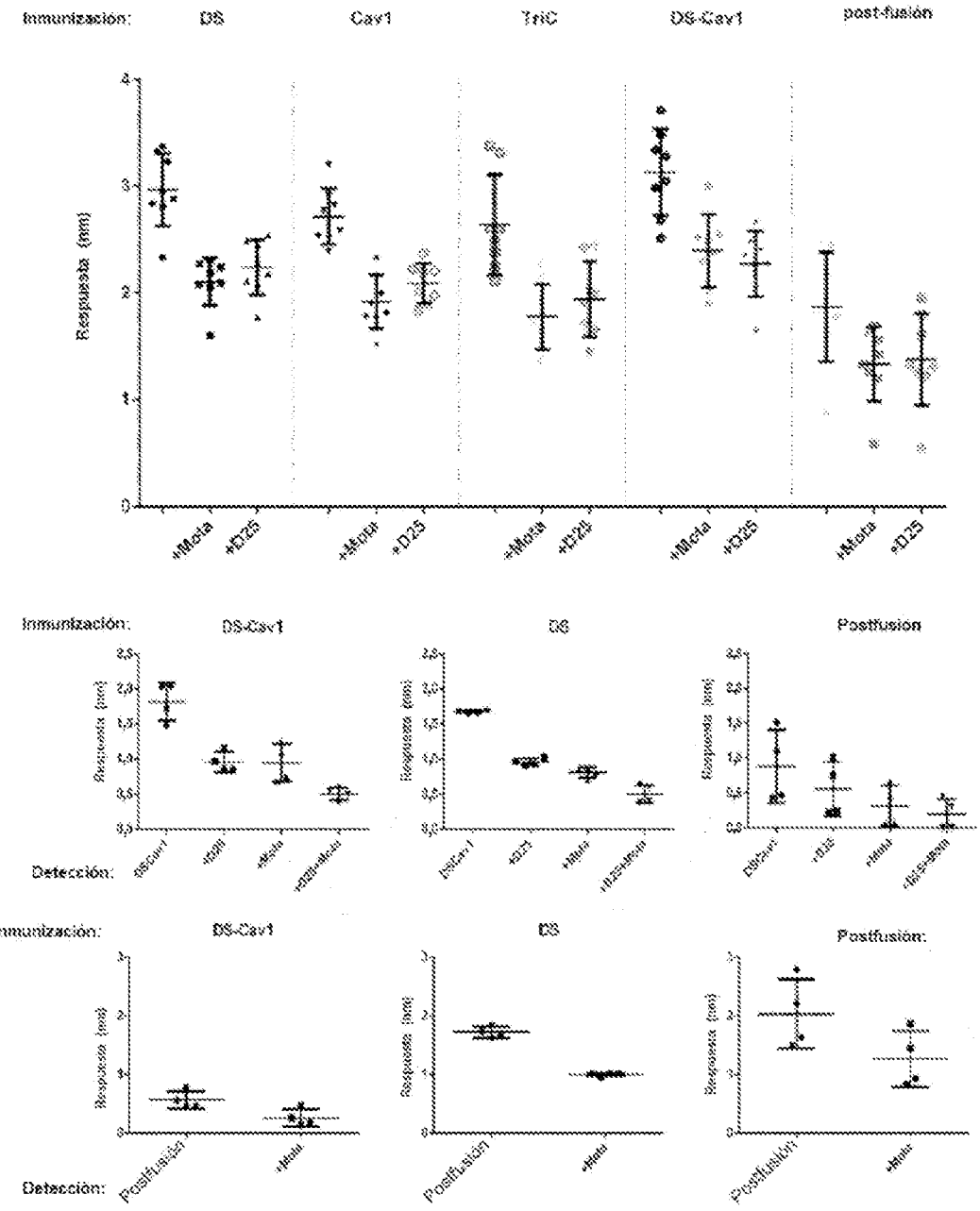


FIG. 39B

Tabla S1. Recopilación de datos cristalográficos y estadística de refinamiento

	DS (pH9,5)	Cav1 (pH9,5)	Cav1 (pH5,5)	DS-Cav1 (pH9,5)	DS-Cav1 (pH5,5)	DS-Cav1-TdC (pH5,5)
Recopilación de datos						
Grupo espacial	*P4132*	*P4132*	*P41212*	*P4132*	*P4132*	*P4132*
Constantes celulares						
a, *b*, *c* (Å)	168,4, 168,4, 168,4	170,9, 170,9, 170,9	170,7, 170,7, 163,9	168,6, 168,6, 168,6	168,6, 168,6, 168,6	170,4, 170,4, 170,4
α, β, γ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Longitud de onda (Å)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Resolución (Å)	50-3,25 (3,31-3,25)	50-3,1 (3,21-3,1)	50-2,40 (2,49-2,40)	50-3,85 (3,99-3,85)	50-3,6 (3,11-3,6)	50-2,9 (2,90-2,80)
R_{sym}	14,9 (84,3)	20,0 (70,7)	11,1 (59,8)	21,4 (93,3)	13,0 (78,3)	13,0 (92,6)
$I / \sigma I$	14,8 (2,2)	11,5 (1,5)	12,6 (2,1)	9,1 (1,3)	23,4 (2,2)	43,9 (1,8)
Compleción (%)	99,6 (96,4)	99,1 (91,7)	95,6 (97,1)	98,5 (89,0)	99,5 (98,1)	99,9 (99,4)
Redundancia	8,3 (4,1)	11,7 (3,8)	4,4 (4,0)	8,1 (4,3)	16,3 (2,5)	12,6 (6,2)
Refinamiento						
Resolución (Å)	3,25	3,10	2,40	3,85	3,00	2,80
Reflexiones únicas	18,345	15,920	90,779	8,287	16,999	21,003
R_{work}, R_{free} (%)	23,7, 27,4	20,6, 23,7	18,7, 21,4	24,7, 28,6	18,6, 23,9	22,5, 25,9
Sin átomos						
Proteína	3033	3946	10,421	3523	3526	3771
Ligando/ion	30	-	70	-	156	-
Agua	0	39	522	-	108	69
Factores B (Å²)						
Proteína	75,1	114,9	56,4	136,7	76,3	106,9
Ligando/ion	136,4	-	101,5	-	155,8	-
Agua	-	87,6	45,3	-	63,4	80,0
Desviaciones R.m.s.						
Longitudes de onda (Å)	0,008	0,012	0,003	0,011	0,010	0,008
Ángulos relativos (°)	1,33	1,24	0,84	1,67	1,42	0,93
Ramachandran						
Regiones favorecidas (%)	93,2	95,3	95,1	93,4	93,3	96,2
Regiones permitidas (%)	3,9	4,3	4,5	5,3	6,0	3,3
Regiones no permitidas (%)	0,3	0,4	0,4	1,3	0,7	0,5

Los valores entre paréntesis son para la cubierta de más alta resolución

FIG. 40

ES 2 981 623 T3

FIG. 41

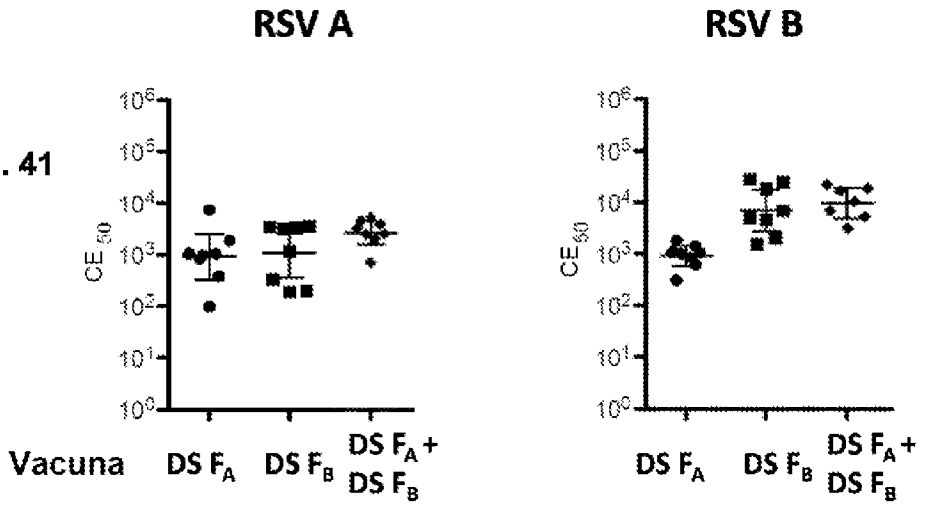

RSV A
RSV B
CE50
Vacuna
DS FA
DS FB
DS FA + DS FB

FIG. 42

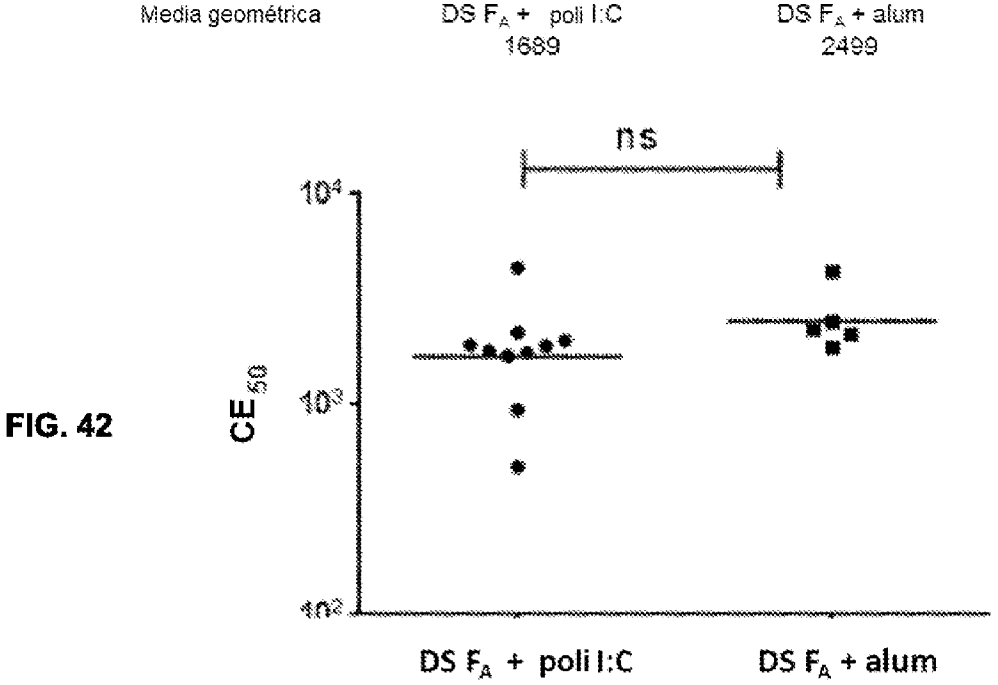

Media geométrica
DS FA + poli I:C
1689
DS FA + alum
2499
ns
CE50
DS FA + poli I:C
DS FA + alum

FIG. 43

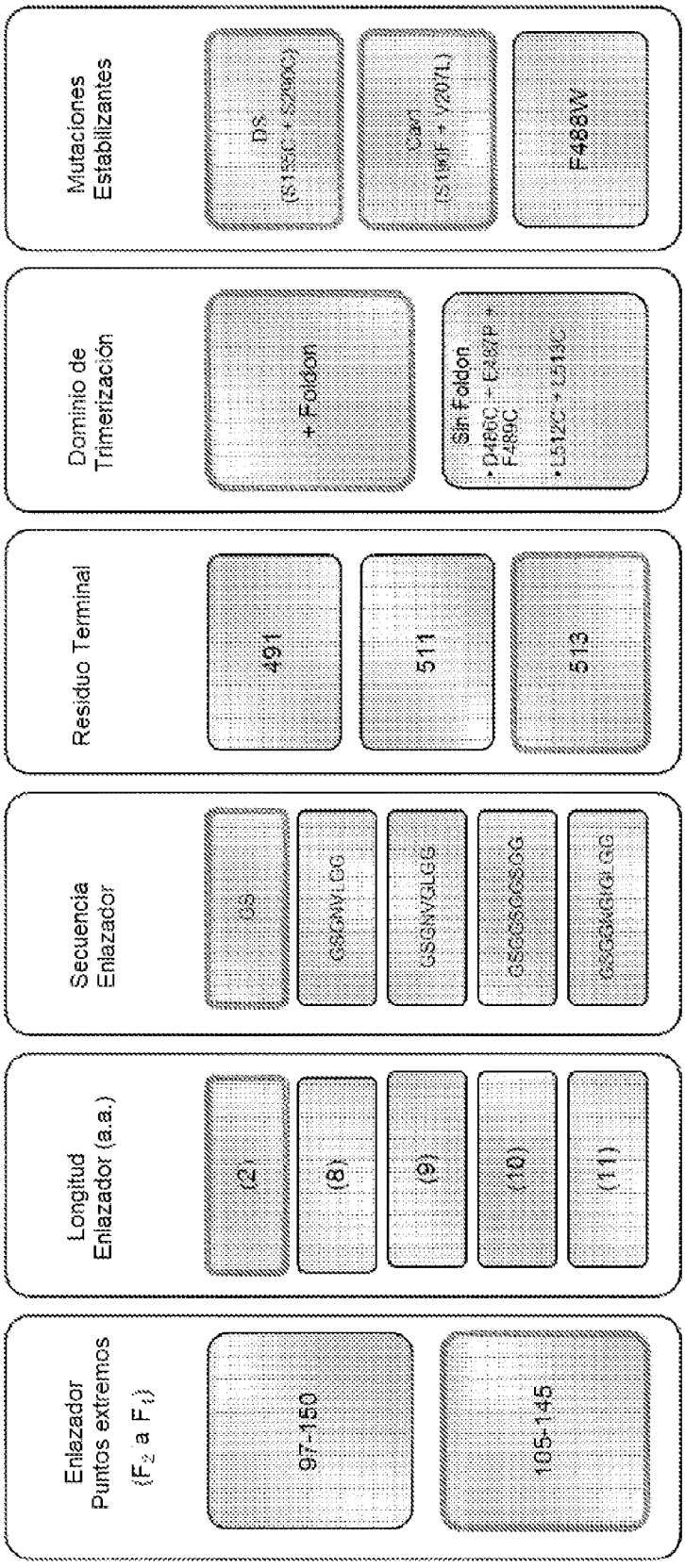

Enlazador Puntos extremos (F_2 a F_1)
97-150
105-145
Longitud Enlazador (a.a.)
(2)
(8)
(9)
(10)
(11)
Secuencia Enlazador
GS
GSGNVLGG
GSGNVGLGS
GSGGSGGSGG
GSGSGGGLGG
Residuo Terminal
491
511
513
Dominio de Trimerización
+ Foldon
Sin Foldon
• D486C – E497F + F498C
• I512C + I513C
Mutaciones Estabilizantes
ds
(S155C + S290C)
Cav1
(S190F + V207L)
F488W

FIG. 44A

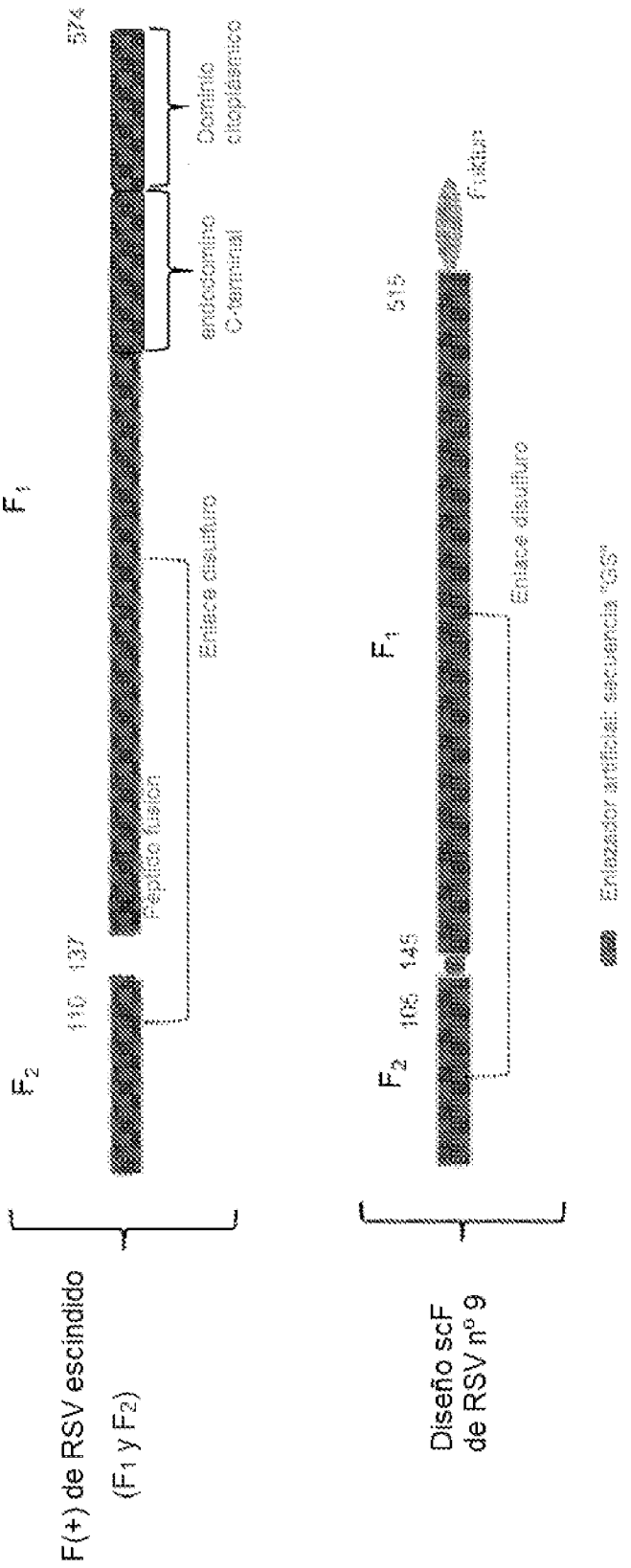

F(+) de RSV escindido
(F1 y F2)
F2
F1
110
137
574
Péptido fusión
Enlace disulfuro
endodominio
C-terminal
Dominio
citoplasmático
Diseño scF
de RSV nº 9
F2
F1
105
145
515
Enlace disulfuro
Enlazador artificial: secuencia "GS"

FIG. 44B

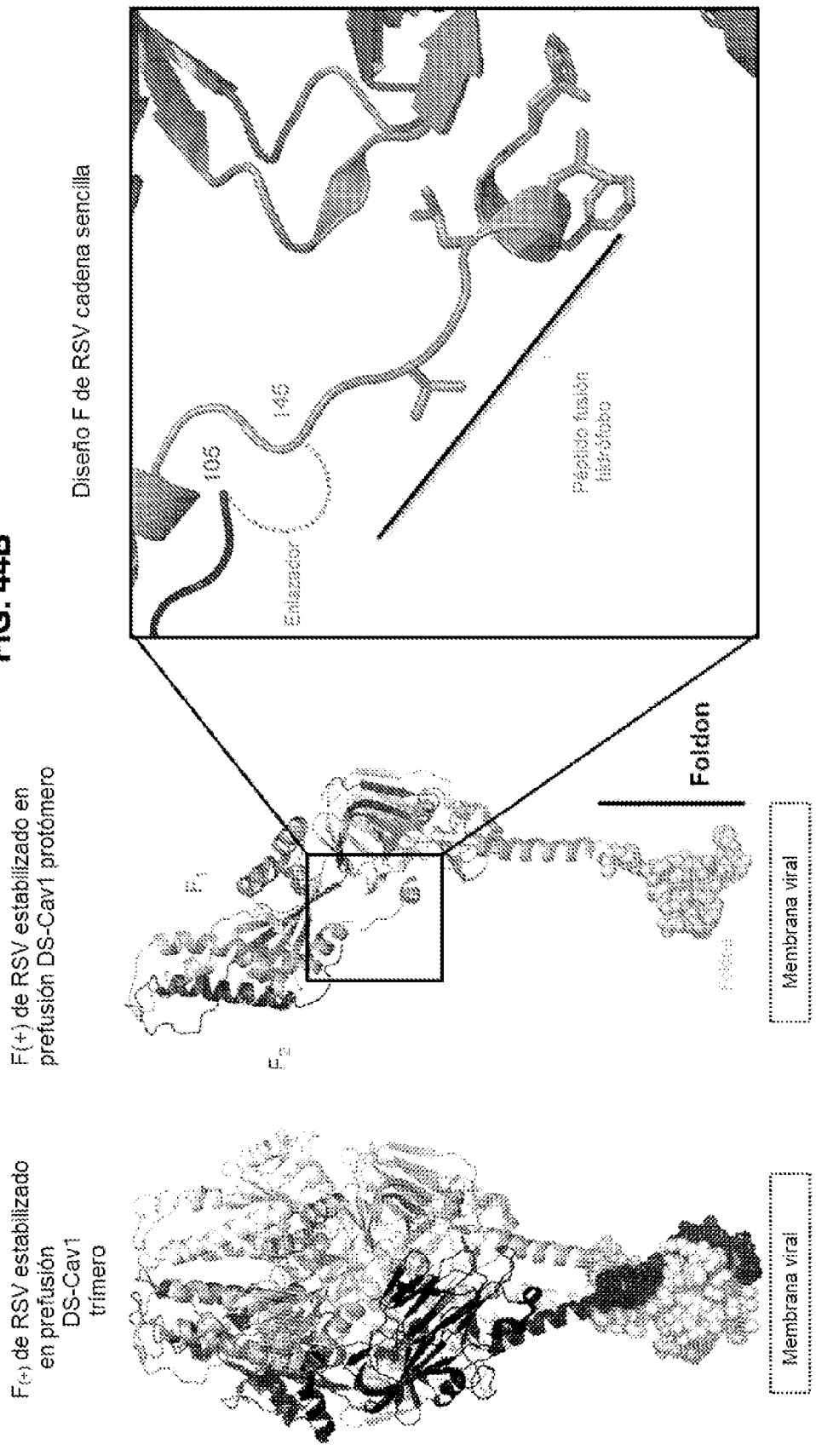

F(+) de RSV estabilizado en prefusión DS-Cav1 trímero
Membrana viral
F(+) de RSV estabilizado en prefusión DS-Cav1 protómero
Foldon
Membrana viral
Diseño F de RSV cadena sencilla
105
145
Enlazador
Péptido fusión fijación

FIG. 45

	Estabilización Prefusión			Longitud enlazador			Producción	
Construcción	Variante	Dominio oligomerización	Residuo C-terminal	Enlazador puntos extremos	Longitud enlazador	Secuencia enlazador	Estado oligomérico	Rendimiento (mg/L)
3	DS-Cav1	Foldon	513	97-150	9	GSGNIGLGG	Trímero	2,0
4	DS		513	97-150	11	GSGGNIGLGG	N.D.	N.D.
	DS-Cav1		513	97-150	11	GSGGNIGLGG	Trímero	3,4
	a		513	97-150	11	GSGGNIGLGG	N.D.	N.D.
6	DS		513	97-150	8	GSGNVLGG	N.D.	N.D.
	DS-Cav1		513	97-150	8	GSGNVLGG	Trímero	1,6
7	DS	CPC	491	97-150	9	GSGNIVGLGG	N.D.	N.D.
	Cav1	CPC	491	97-150	9	GSGNIVGLGG	Agregado	0,45
	DS-Cav1	CPC	491	97-150	9	GSGNIVGLGG	Agregado	0,3
8	DS	CC	511	97-150	9	GSGNIVGLGG	Monómero	0,6
					9		Trímero	0,6
	DS-Cav1	CC	511	97-150	9	GSGNIVGLGG	Monómero	0,8
					2		Trímero	1,0
	DS-Cav1	Nombre	511	97-150	9	GSGNIVGLGG	Monómero	0,5
					2		Trímero	0,6
9	DS-Cav1	Foldon	513	105-145	2	GS	Trímero	3,1
	a	Foldon	513	105-145	2	GS	Trímero	4,2
	DS	Foldon	513	105-145	2	GS	Trímero	4,3
	Cav1	Foldon	513	105-145	2	GS	Trímero	5,2
10	DS	CPC	491	105-145	2	GS	Monómero	0,3
							Trímero	0,4
	DS-Cav1	CPC	491	105-145	2	GS	Monómero	0,5
							Trímero	0,5
11	DS	CC	513	105-145	2	GS	Monómero	0,8
	Cav1	CC	513	105-145	2	GS	Monómero	1,0

ES 2 981 623 T3

FIG. 46A

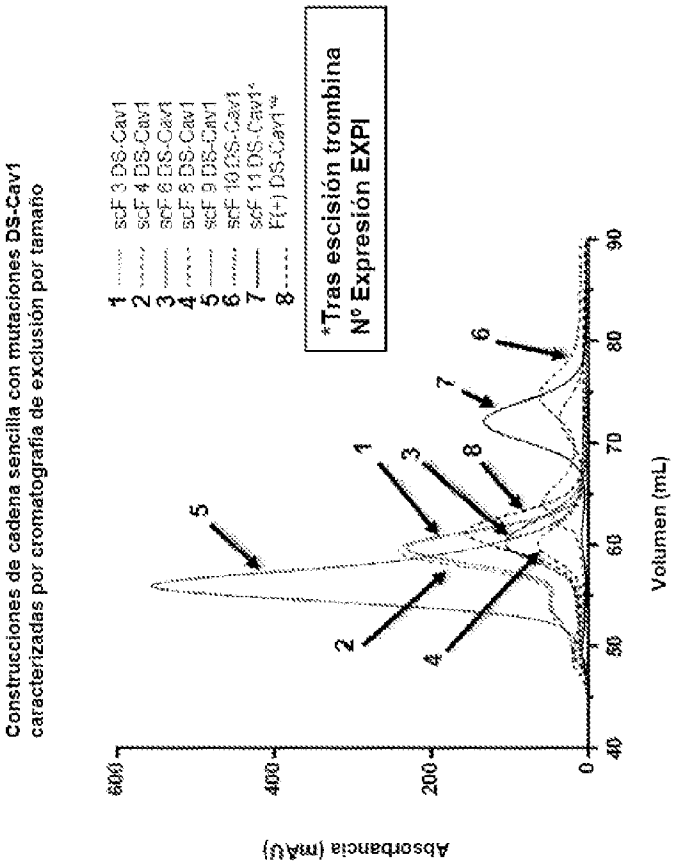


FIG. 46B

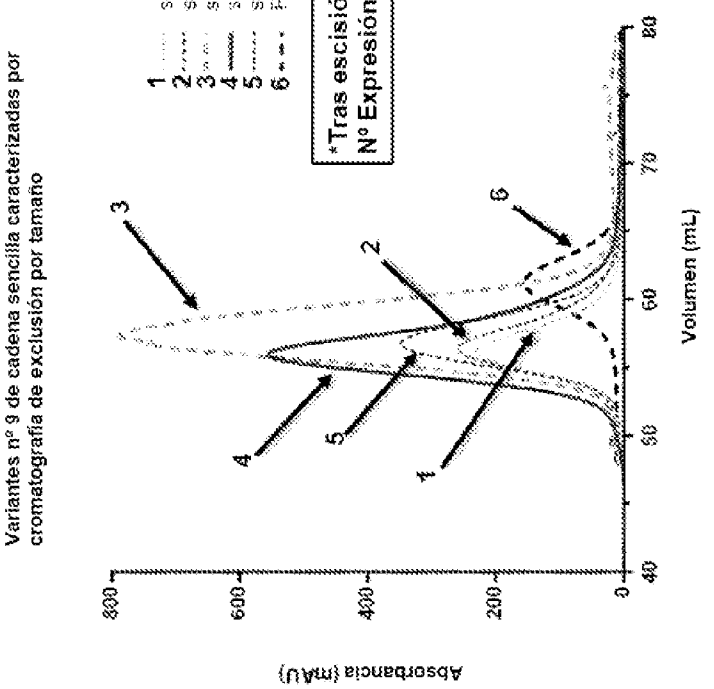


FIG. 47

		Valor anticuerpo K_D (nM)					
		Sitio Ø			Sitio Ø'		Sitio N
Construcción	Variante	D25	AM22	5C4	Paliv	Mota	101F
F(+)	DS-Cav1	0,15	<0,01	13	23	0,04	3,2
scF n° 9	DS-Cav1	0,06	0,1	6,0	4,0	8,9	2,7

$ Palivizumab (Paliv), Motavizumab (Mota).

FIG. 48

Recopilación de datos y refinamiento	F de RSV nº 9 DS-Cav1 de cadena sencilla
Grupo espacial	$P\,4_1\,3\,2$
Resolución (Å)	50-3,21 (3,36-3,21)
$I / \sigma I$	2,84
Nº reflexiones	521334
Reflexiones únicas	76368
Compleción (%)	98
Redundancia promedio	4,3
$R_{trabajo}$ / R_{libre} (%)	19,3 / 23,9

$R = \Sigma hkl||Fobs| - |Fcalc||/\Sigma hkl|Fobs|$.

R_{libre} se calcula a partir de 5% de las reflexiones excluidas del refinamiento

FIG. 49A

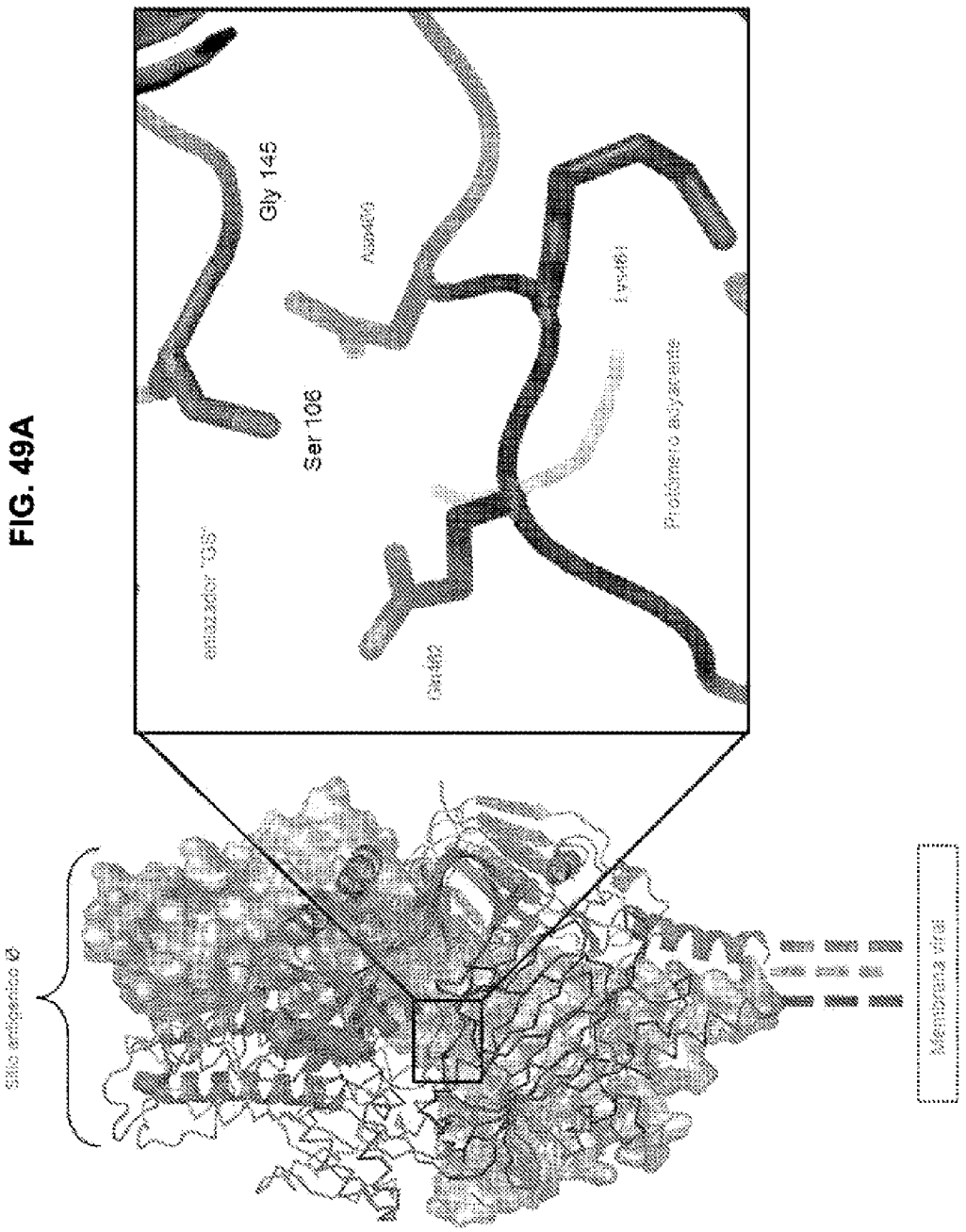

Sitio antigénico Ø
Membrana viral
Gly 145
Ser 106
Asn40
Protómero adyacente

FIG. 49B

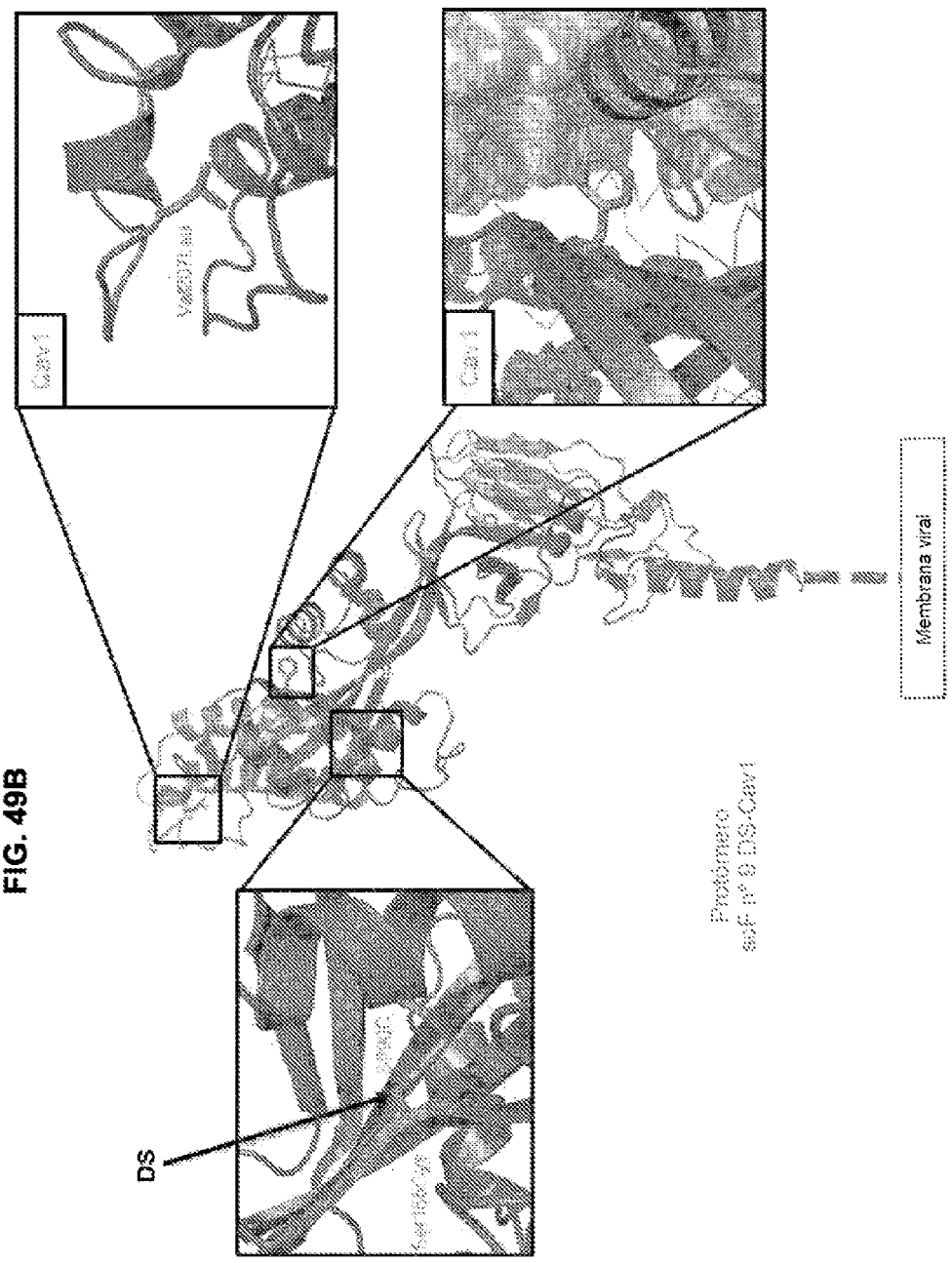


FIG. 50

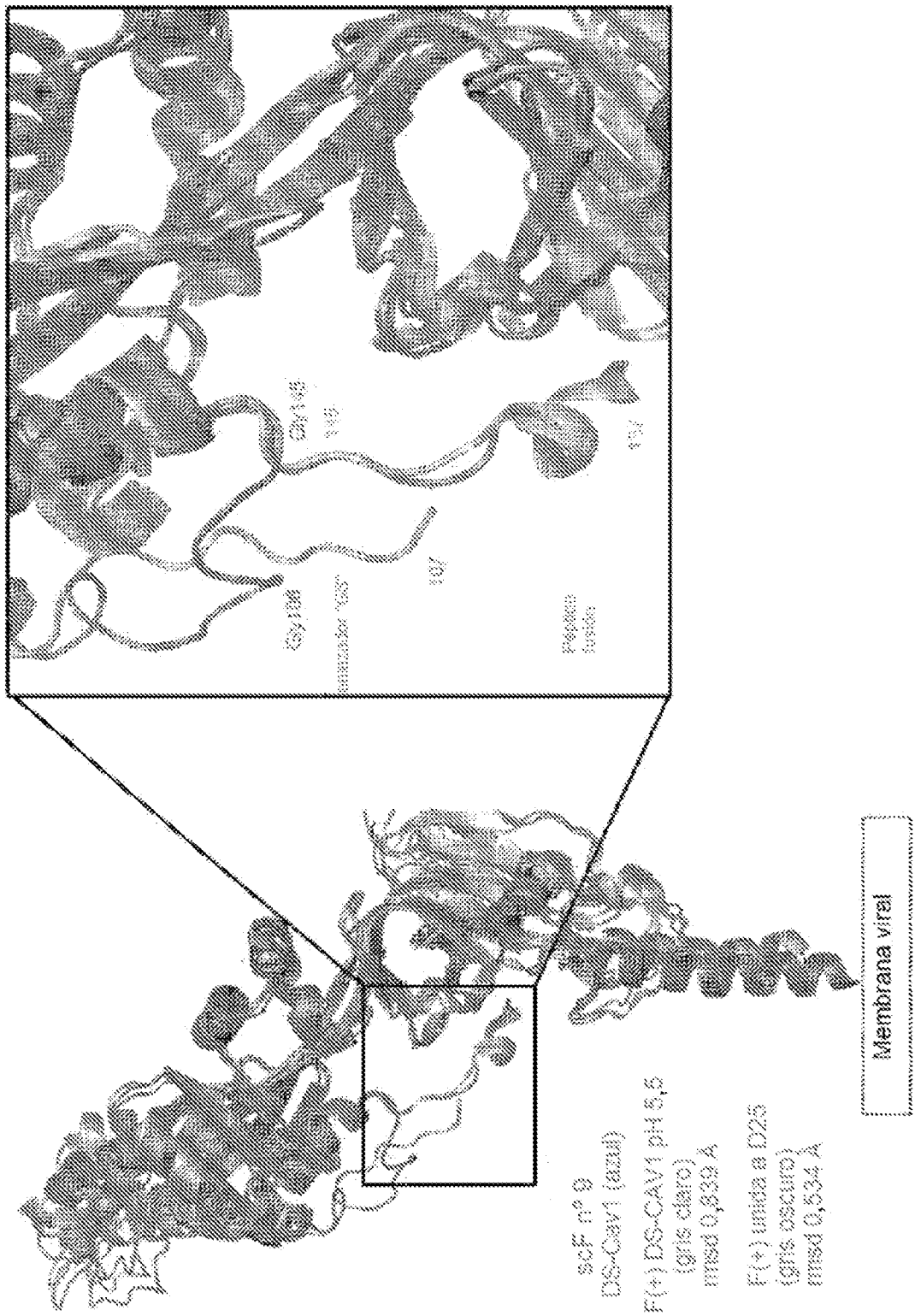

Membrana viral
scF nº 6
DS-Cav1 (azul)
F(+) DS-CAV1 pH 6,5
(gris claro)
rmsd 0,839 Å
F(+) unida a D25
(gris oscuro)
rmsd 0,534 Å

FIG. 51

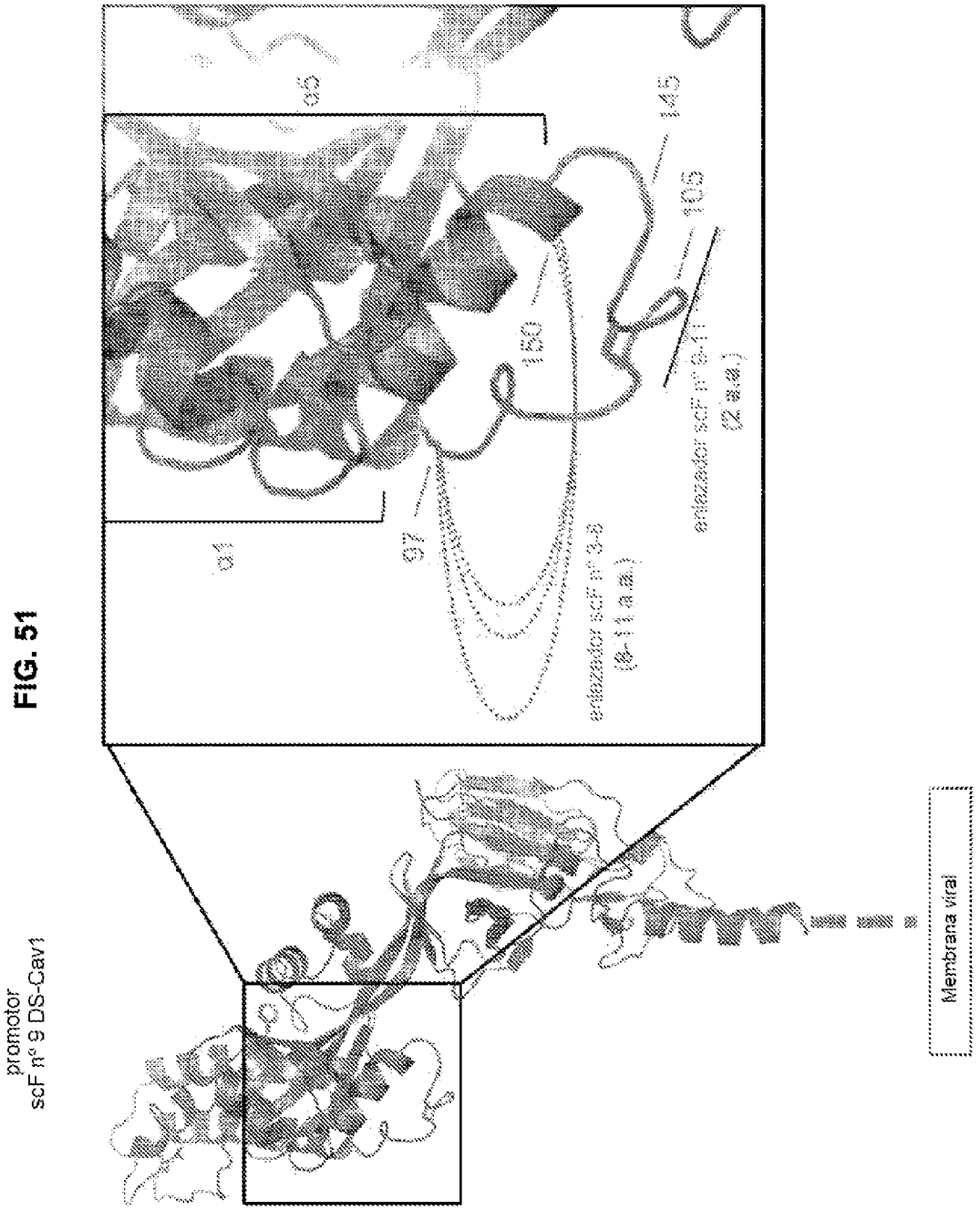

promotor
scF nº 9 DS-Cav1
Membrana viral
α5
α1
67
150
105
145
enlazador scF nº 3-8
(6-11 a.a.)
enlazador scF nº 8-11
(2 a.a.)

FIG. 52

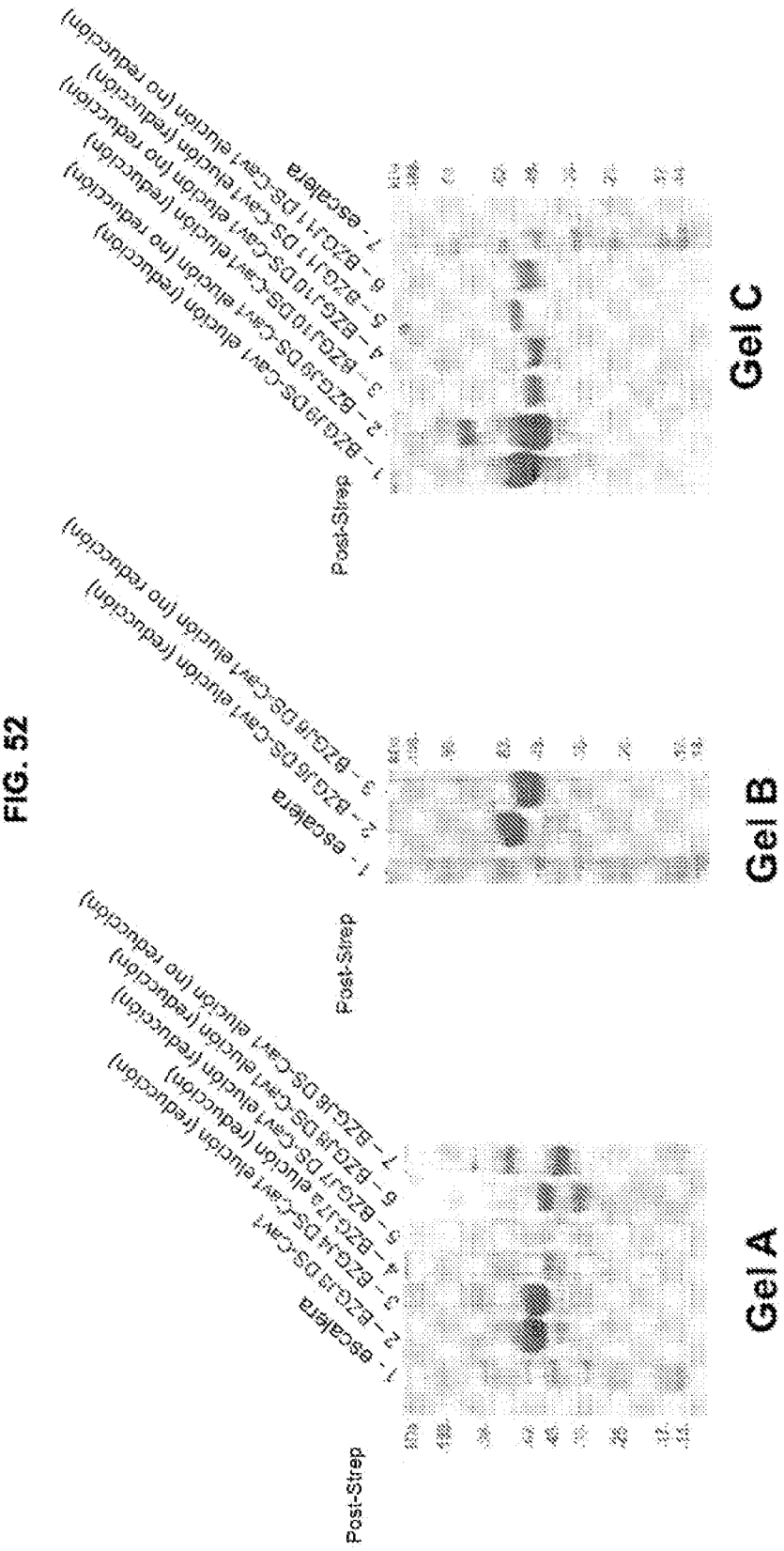
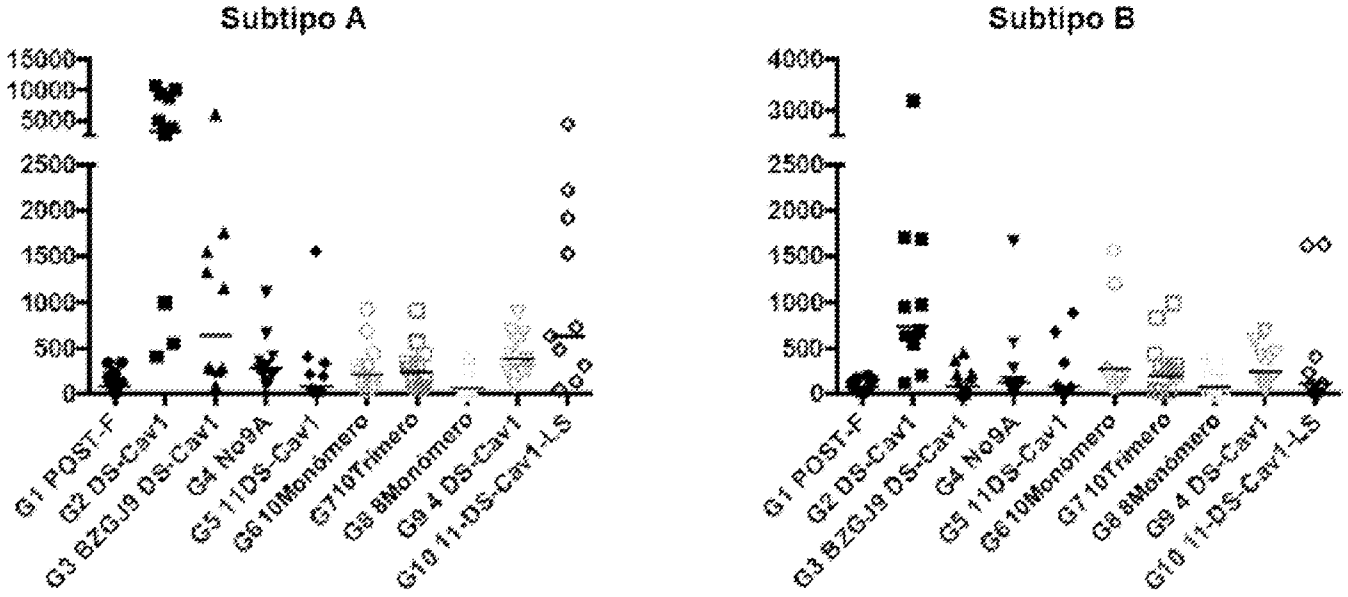

Gel A
Post-Strep
1 - escalera
2 - BZG.J3 DS-Cav1
3 - BZG.J4 DS-Cav1
4 - BZG.J7 elución (reducción)
5 - BZG.J7 DS-Cav1 elución (reducción)
6 - BZG.J8 DS-Cav1 elución (no reducción)
7 - BZG.J8 DS-Cav1 elución (no reducción)
Gel B
Post-Strep
1 - escalera
2 - BZG.J8 DS-Cav1 elución (reducción)
3 - BZG.J8 DS-Cav1 elución (no reducción)
Gel C
Post-Strep
1 - BZG.J9 DS-Cav1 elución (reducción)
2 - BZG.J9 DS-Cav1 elución (no reducción)
3 - BZG.J10 DS-Cav1 elución (reducción)
4 - BZG.J10 DS-Cav1 elución (no reducción)
5 - BZG.J11 DS-Cav1 elución (reducción)
6 - BZG.J11 DS-Cav1 elución (no reducción)
7 - escalera

FIG. 53

Datos neutralización semana 5 10 animales/grupo

Inmunizaciones en Semana 0 y Semana 3 con 10 ug proteína + 50 ug Poli I:C por animal

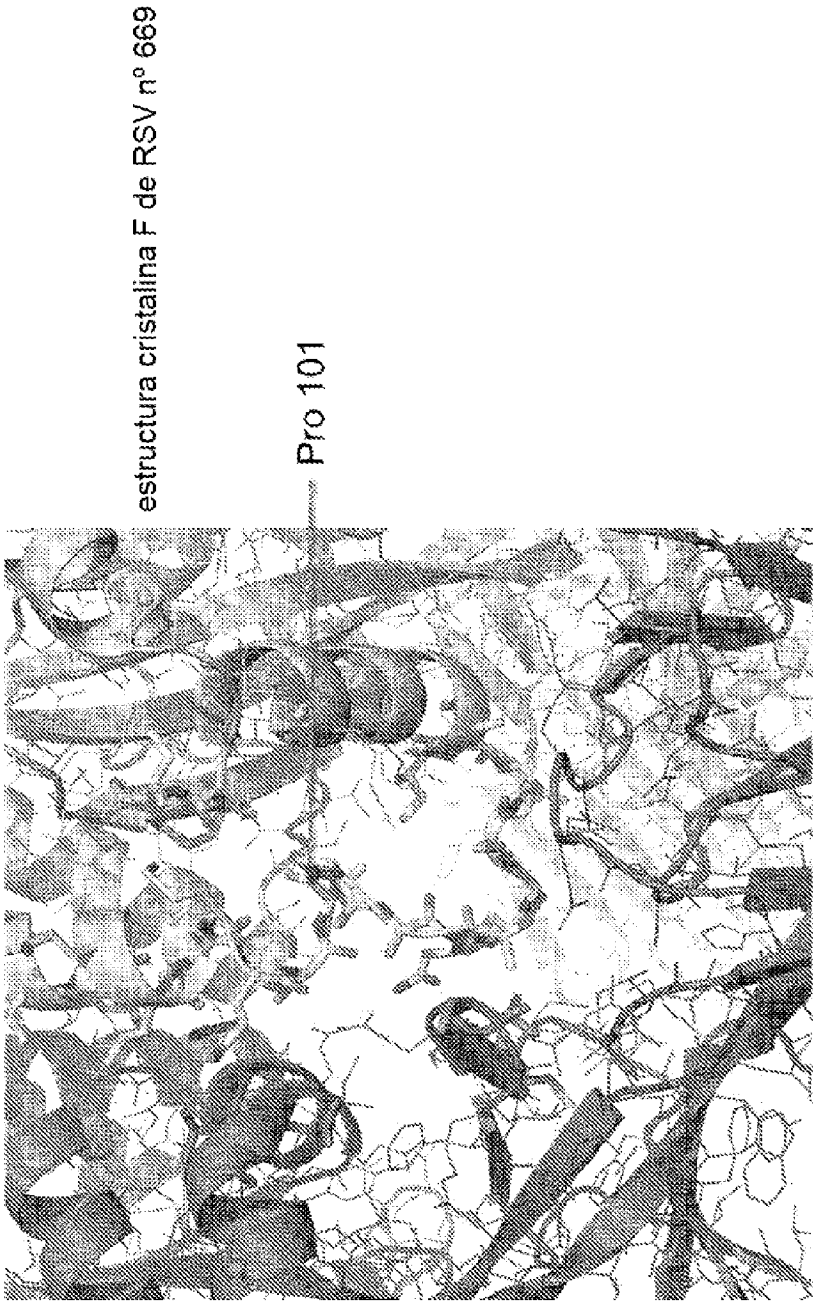


Subtipo A	POST-F	DS-Cav1	BZG/J9 DS-Cav1	No9A	11DS-Cav1	Monómero 6IDS	Trímero 6IDS	Monómero 8IDS	4DS-Cav1	11DS-Cav1-LS
Media	1571	5000	1138	2500	2500	50	2500	1138	2500	1138
Media geométrica	1138	5000	1138	2500	2500	50	2500	1138	2500	1138

Subtipo B	POST-F	DS-Cav1	BZG/J9 DS-Cav1	No9A	11DS-Cav1	Monómero 6IDS	Trímero 6IDS	Monómero 8IDS	4DS-Cav1	11DS-Cav1-LS
Media	354	2500	354	354	354	354	354	354	354	354
Media geométrica	354	2500	354	354	354	354	354	354	354	354

FIG. 54

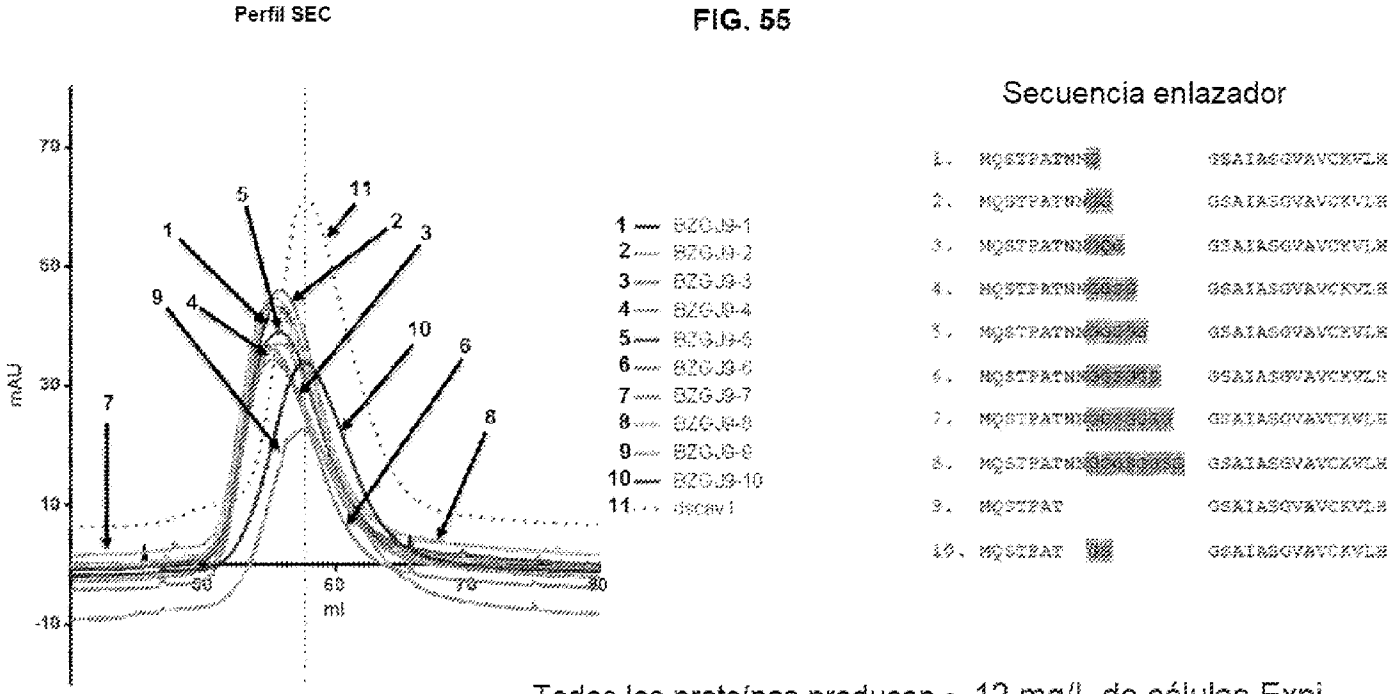
Región de enlazador de cadena sencilla se puede mejorar eliminando Prolina 101 o acortando/mutando los residuos de enlazador y residuos adyacentes



Mejora adicional de nº 669 de Cadena Sencilla (SC) y evaluación mediante filtración en gel

FIG. 55

Superose 6 (columna 120 ml)



Todas las proteínas producen ~ 12 mg/L de células Expi

La eliminación de los residuos 104NN105 resulta en especies trímeras mejoradas

F Prefusión RSV Ferritina

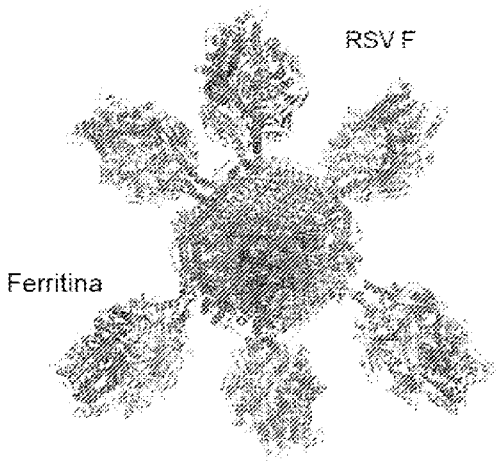
Producto génico sencillo

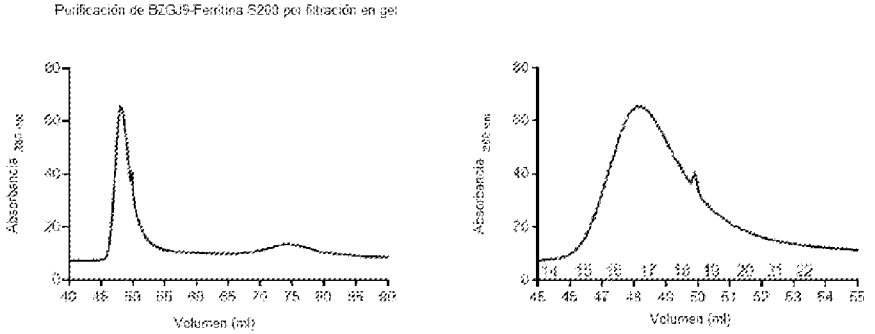
FIG. 56

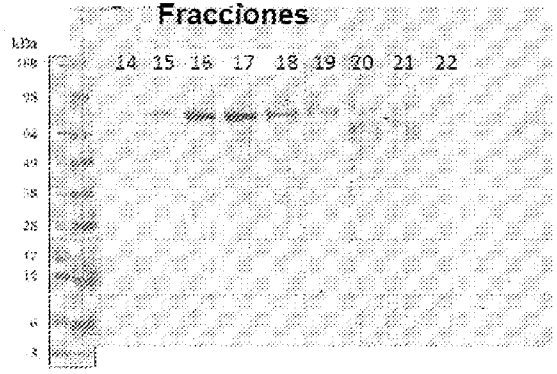


Rendimiento expresión
0.6-1.0 mg/L

Se auto-ensambla en un 24-mero con 8 picos de F de RSV sobre la superficie







Las Fracciones 15-18 se agruparon y se utilizaron para inmunizaciones

FIG. 57

Estabilidad física de nº 669 enlazada a Ferritina comparado con RSV F DS-Cav1

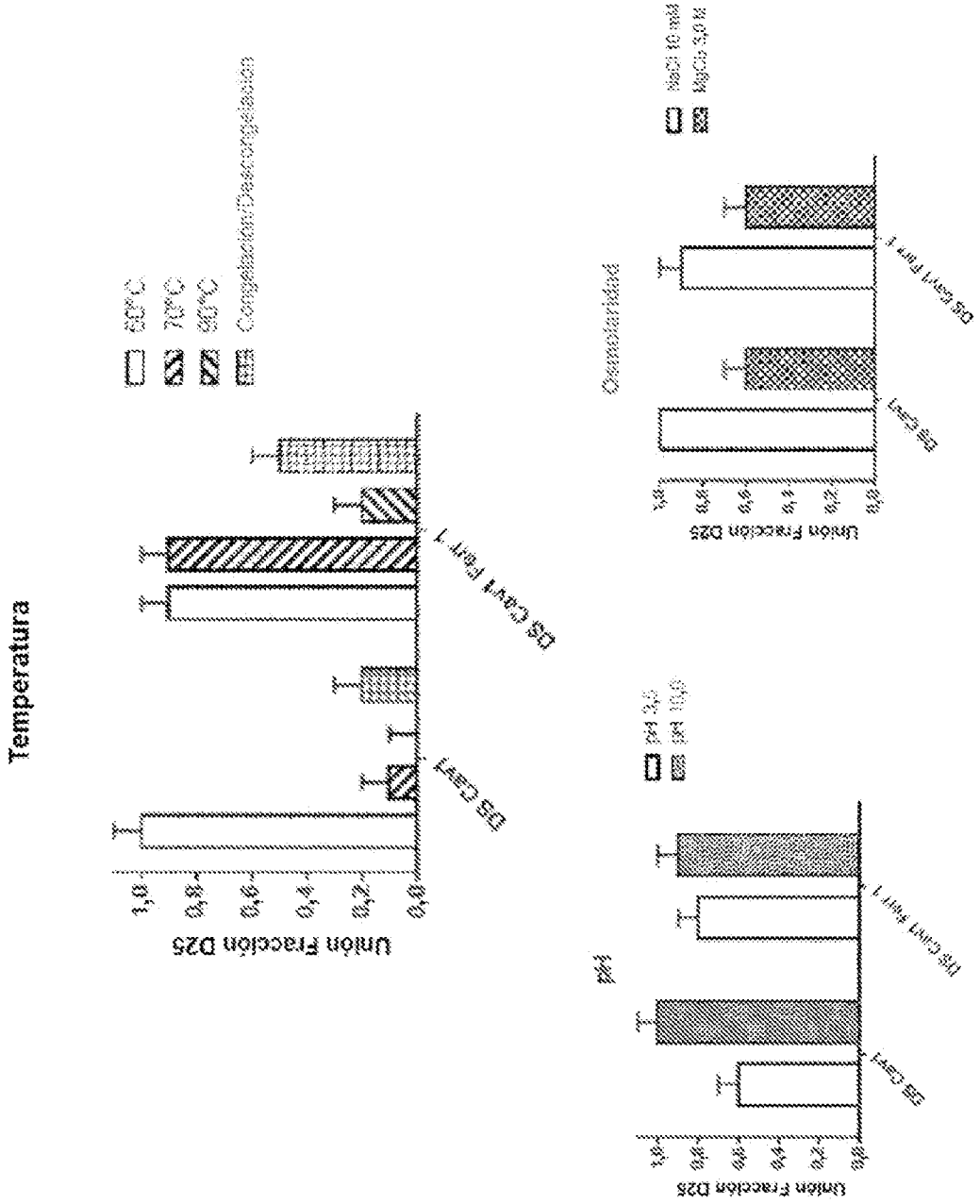


FIG. 58A

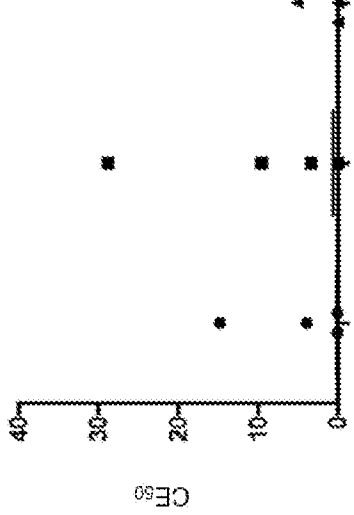


FIG. 58B

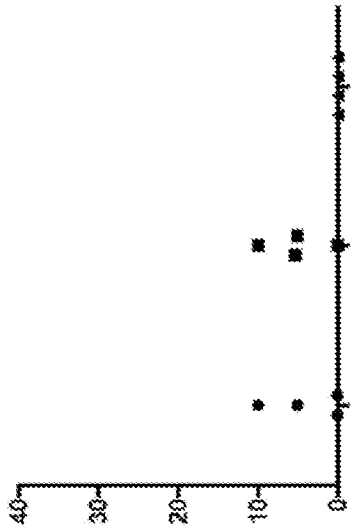


FIG. 58C

	DS-Cav1	Ferritina cadena sencilla DS-Cav1	BZG J9 DS-Cav1 cadena sencilla
Número de valores	4	4	4
Media	4,656	10,41	1,25
Desviación Est.	6,974	12,86	2,5
Error Típico de Media	3,487	6,431	1,25
Media geométrica	0,2038	0,5074	0,0002659

FIG. 59B

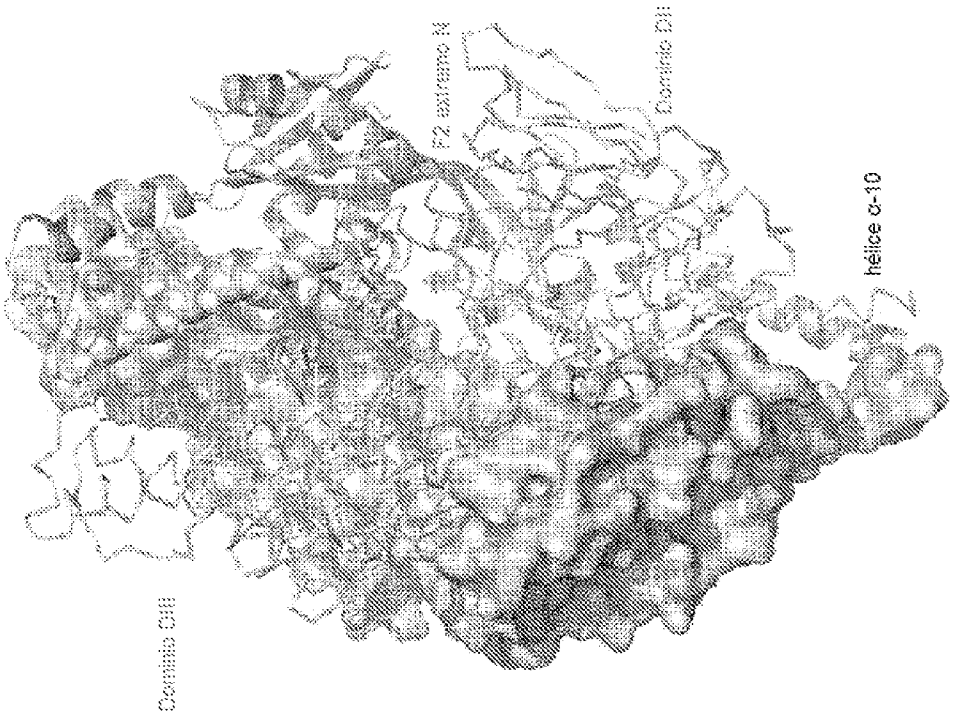


FIG. 59A

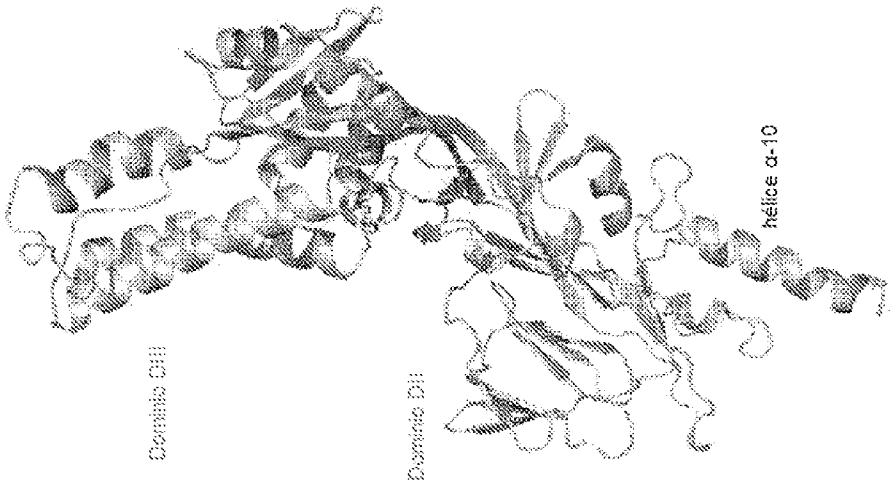


FIG. 60B

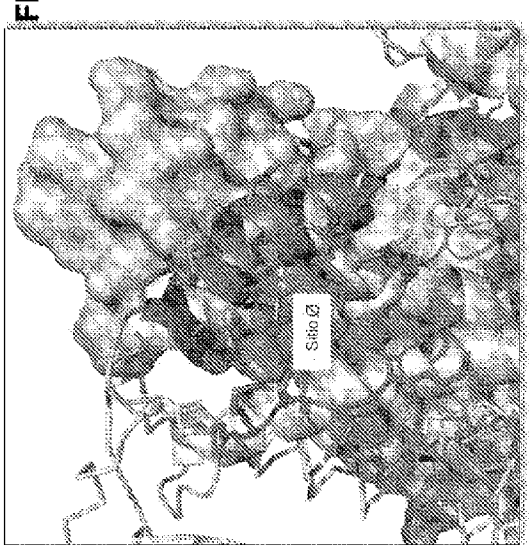


FIG. 60D

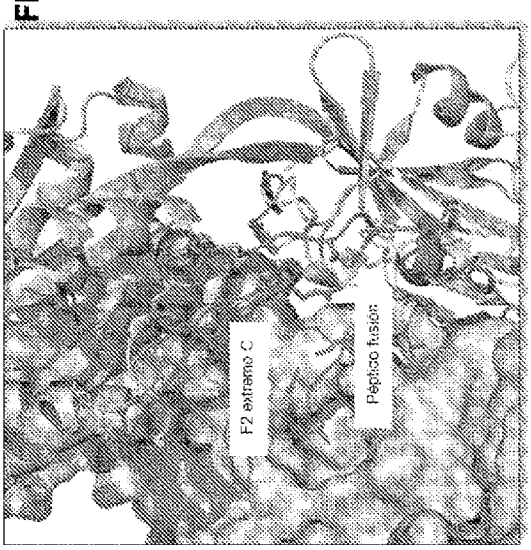


FIG. 60A



FIG. 60C

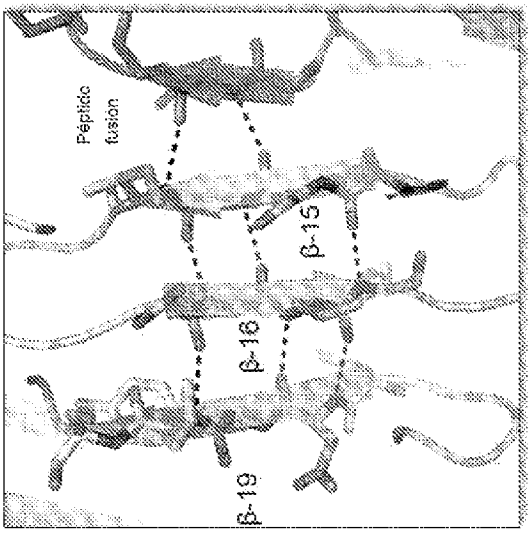
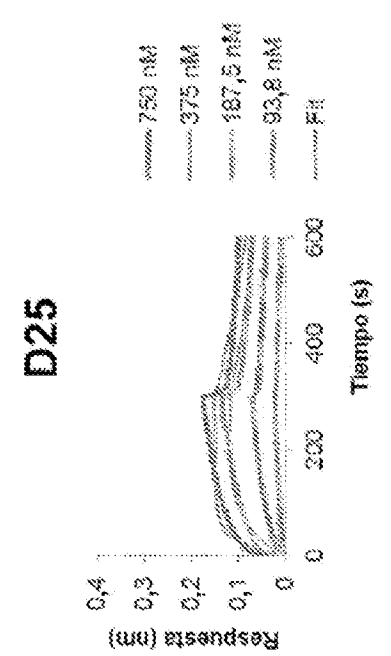
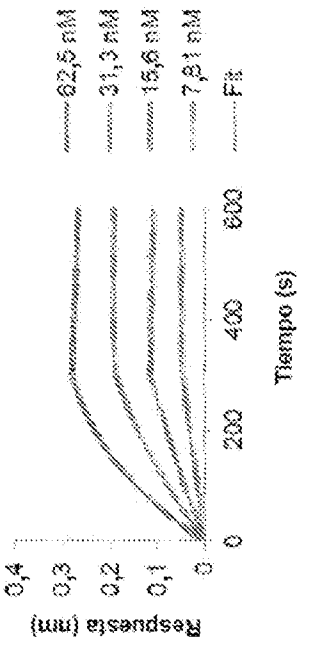


FIG. 61A







Anticuerpo	KD (nM)	Error KD (nM)
AM22 Fab	<0,001	0,312
D25 Fab	37,1	8,776
Mota Fab	0,862	0,049
5C4 Fab	0	0

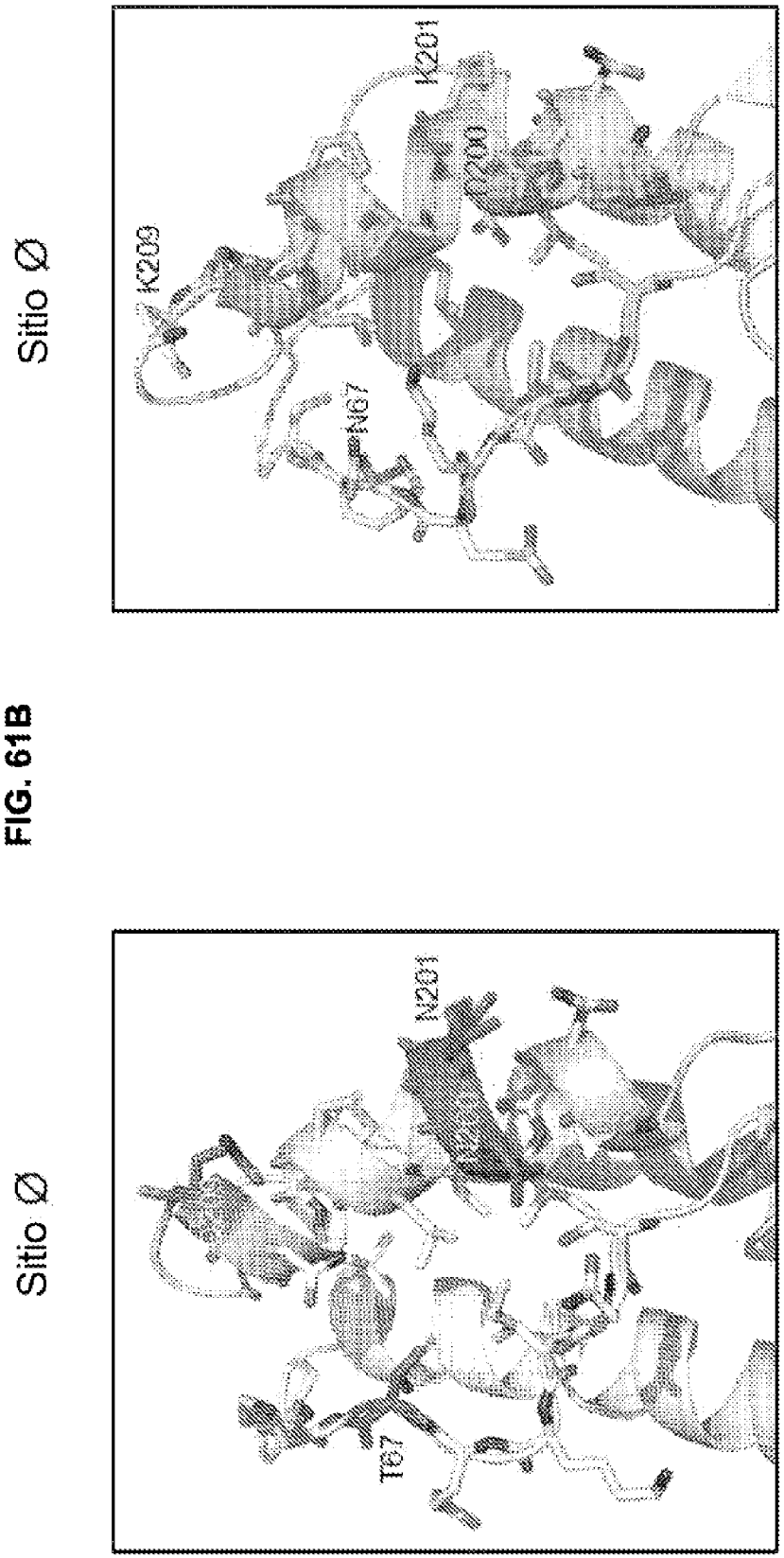


FIG. 61B

FIG. 62A

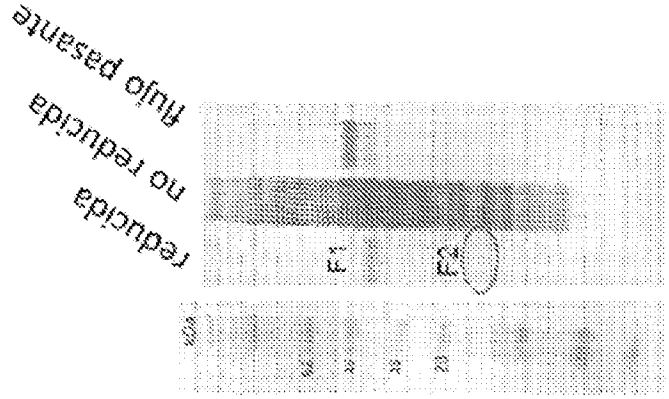


FIG. 62B

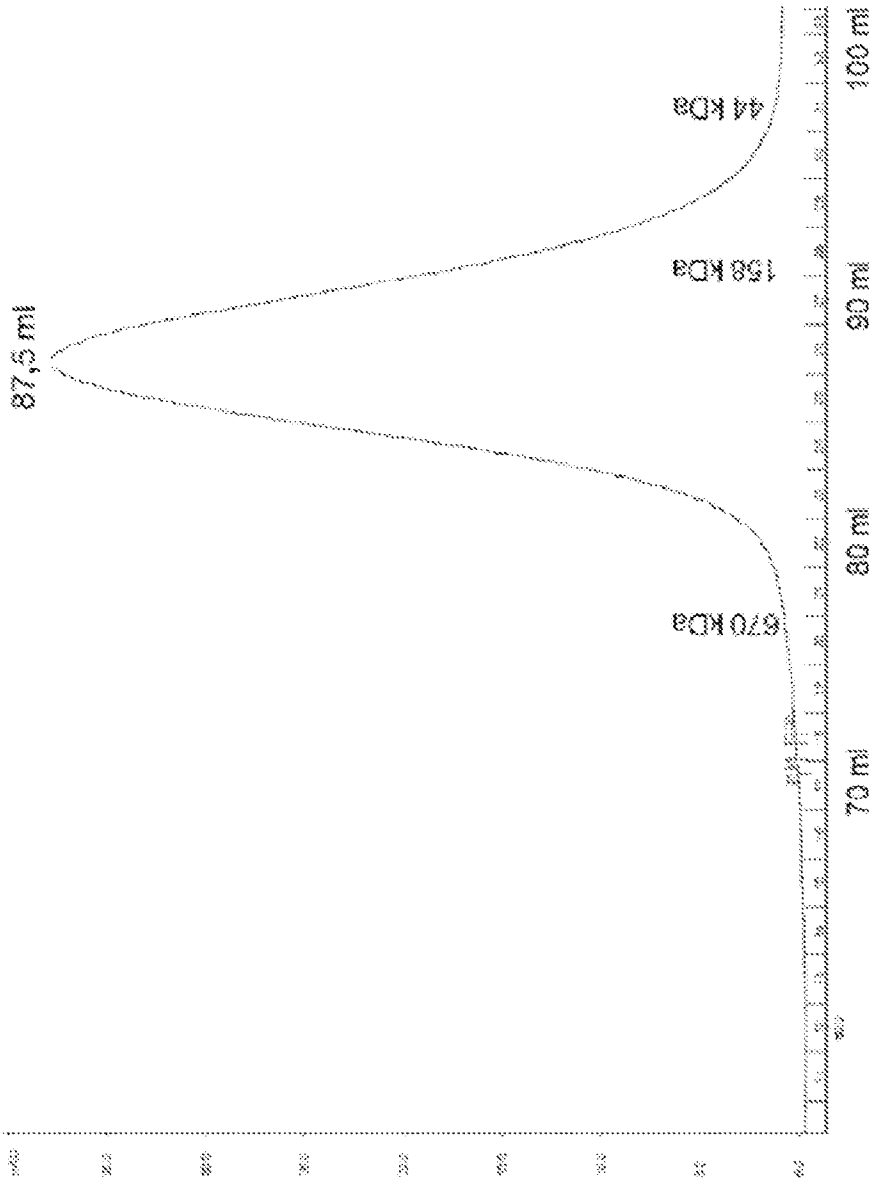


FIG. 63

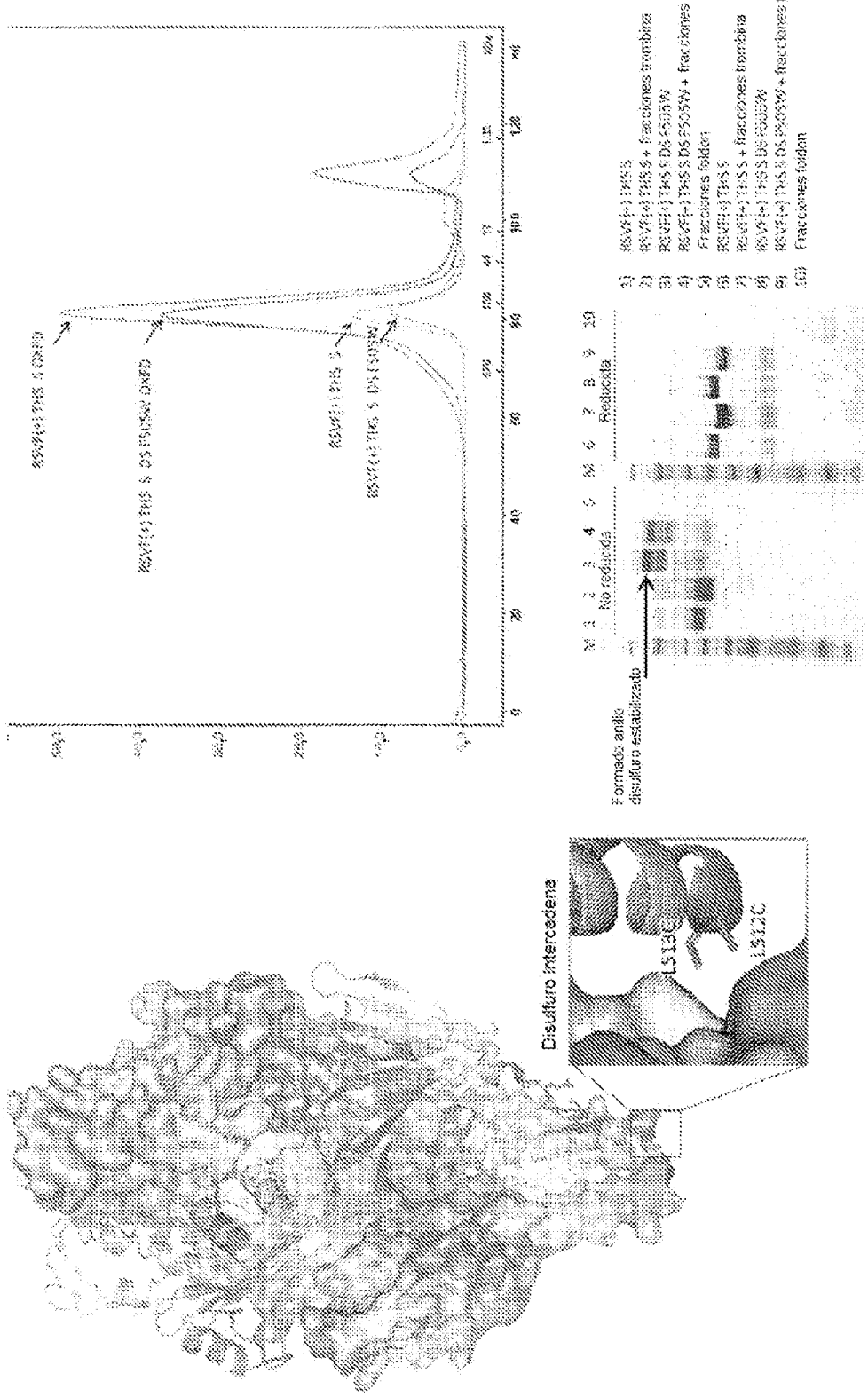
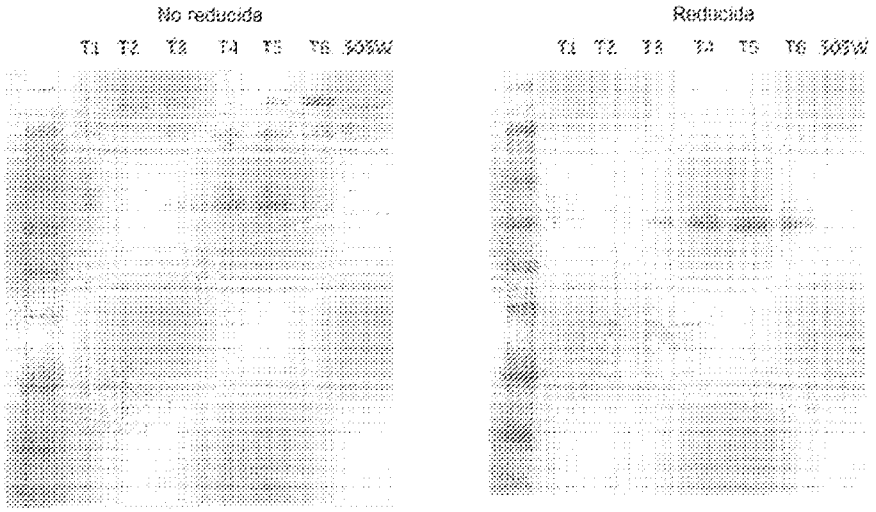

Disulfuro intercadena
LS15C
LS12C
Formado antes
disulfuro estabilizado
No reducida
Reducida
Fracciones folding

FIG. 64

GSJCCCola1-6xFd y DS F505W post-estreptactina



Construcción	mg	mg/L	Motivo entre S11 y foldon escindible	SEQ ID NO:
GSJCCCola 1xFd	1,05	1,05	CCIHVVEAGKETTNIMLTT	840
GSJCCCola 2xFd	0,33	0,33	LLIHVVEACCETTNIMLTT	841
GSJCCCola 3xFd	0,99	0,99	LLIHVVEAGKETTNICCTT	842
GSJCCCola 4xFd	1,53	1,53	LLIHVVEAGKETTNCCITT	843
GSJCCCola 5xFd	2,13	2,13	CCIHVVEAGKETTN	844
GSJCCCola 6xFd	1,65	1,65	LLIHVVECCETTN	845
RSVF + THS S DS F505W OXFD	0,81	0,81	CC	

FIG. 65

Perfiles de filtración en gel de proteínas F de RSV

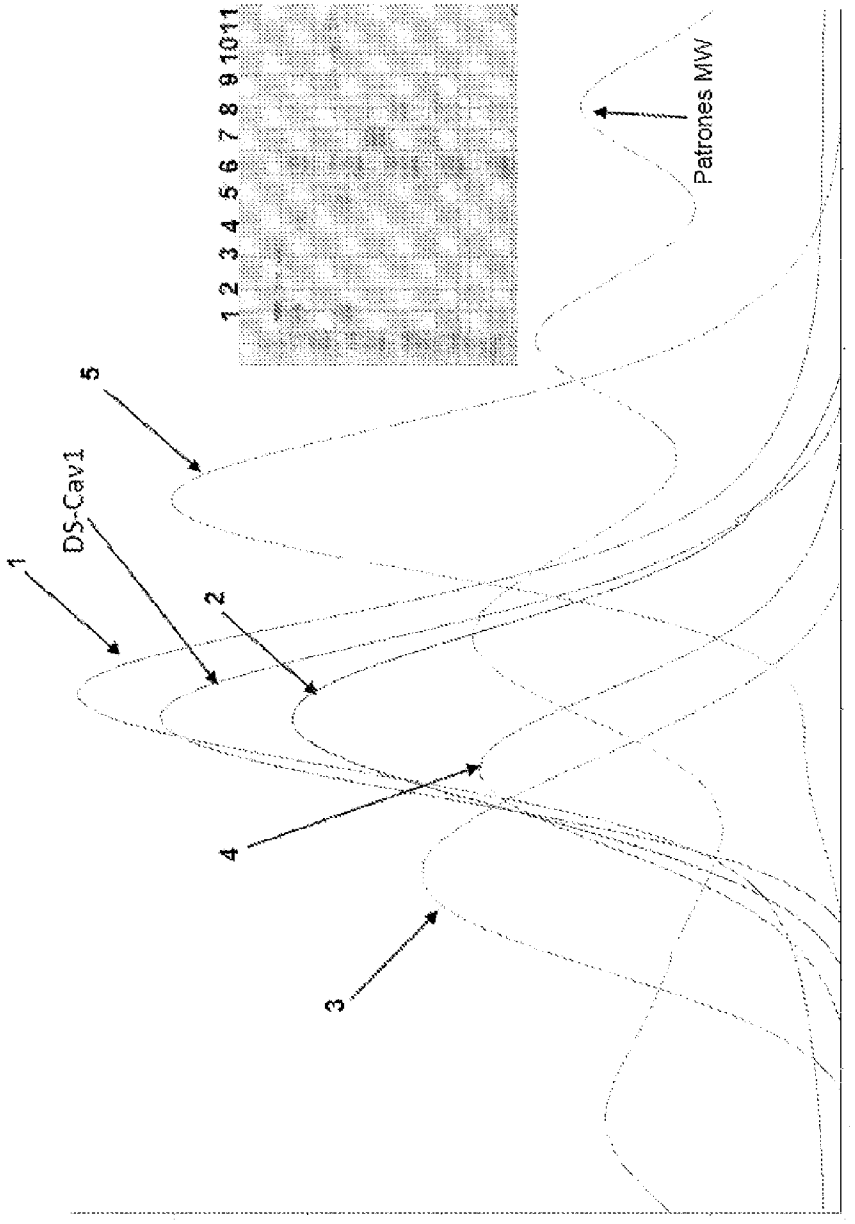


FIG. 66 Disulfuros interprotómeros que estabilizan el trímero de proteína F después de la eliminación del foldon



FIG. 67

Detección disulfuro de interfaz de protómero en cadena sencilla y formato DS Cav1

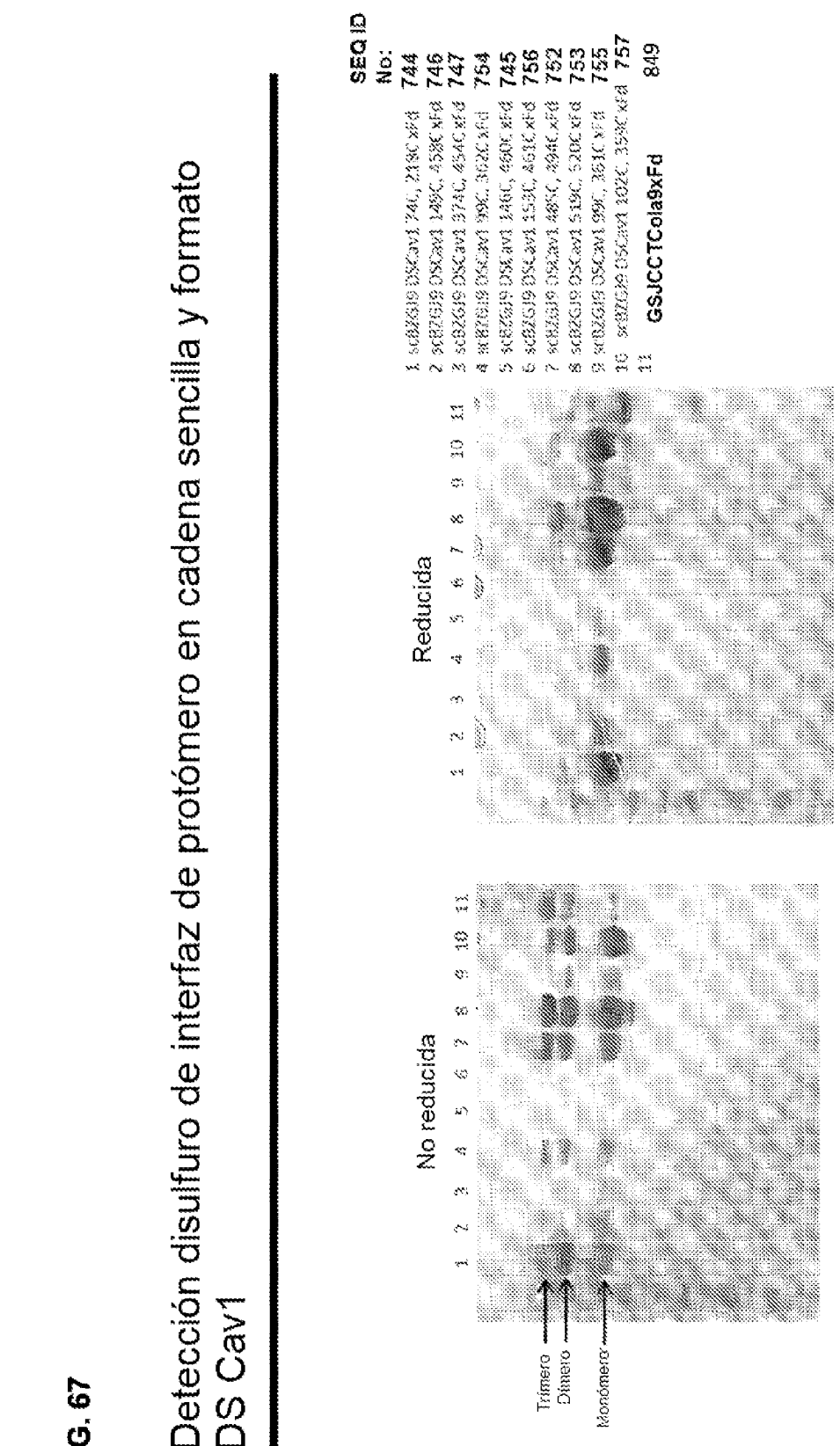


FIG. 68 Comparación de proteínas CSGSJ (sin foldon) con DS Cav1 mostrando formación de pico monómero y trímero

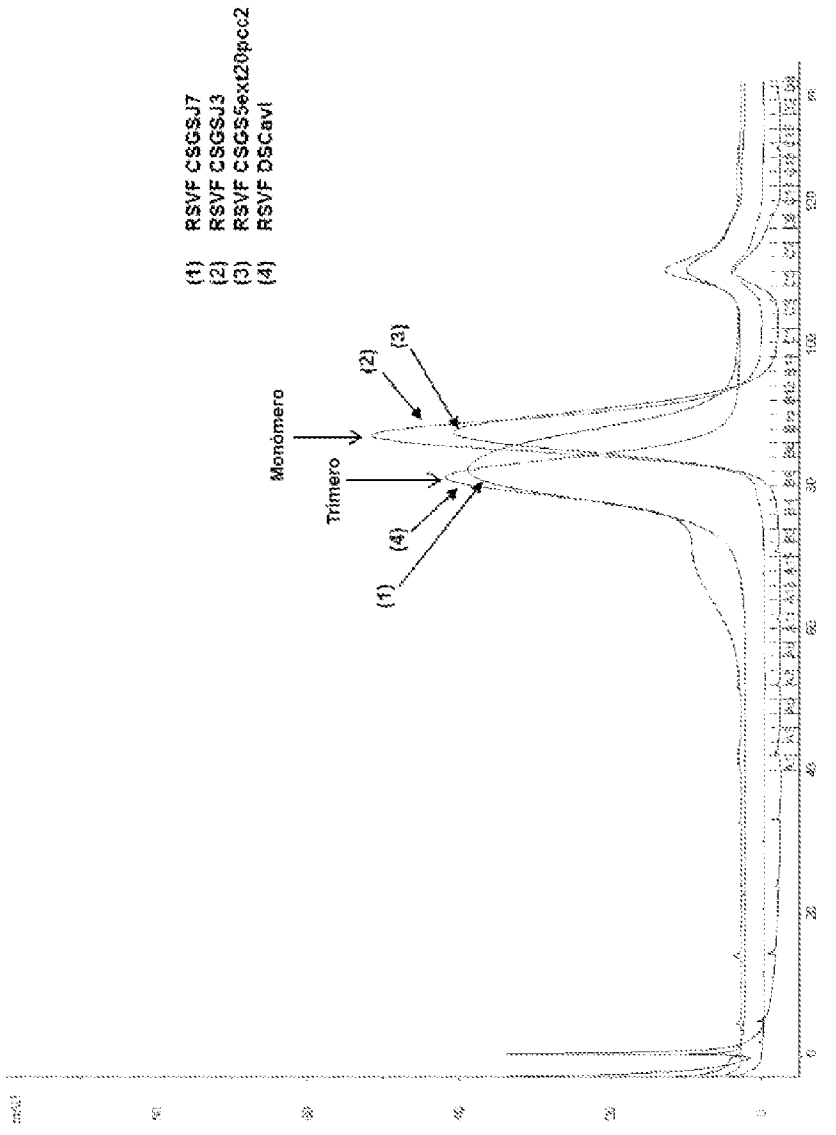


FIG. 69A

		Condición					
	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
[illegible]		[illegible]	2,629	0,979	2,456	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 1	901	[illegible]	2,9389	0,0589	2,894	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 2	902	[illegible]	2,8486	0,0634	2,721	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 3	903	[illegible]	2,9017	0,0604	2,287	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 4	904	[illegible]	2,9127	0,0881	2,852	0,0818	[illegible]
GSJ 1Cavi 5	905	[illegible]	2,9364	0,0619	2,381	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 6	906	[illegible]	2,9238	0,0631	2,38	0,2496	[illegible]
GSJ 1Cavi 7	907	[illegible]	2,949	0,0896	2,857	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 8	908	1,8173	2,181	0,0833	2,622	0,1223	2,2066
GSJ 1Cavi 9	909	0,0604	2,1358	[illegible]	2,071	0,2666	0,2809
GSJ 1Cavi 10	910	[illegible]	2,9788	0,075	2,488	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 11	911	[illegible]	2,949	0,0662	2,473	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 12	912	[illegible]	2,9347	0,081	2,689	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 13	913	[illegible]	2,883	0,0718	2,431	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 14	914	0,074	2,1171	0,0868	2,11	0,458	[illegible]
GSJ 1Cavi 15	915	[illegible]	2,9177	0,0866	2,268	0,1987	[illegible]
GSJ 1Cavi 16	916	[illegible]	2,9362	0,0821	2,824	0,688	[illegible]
GSJ 1Cavi 17	917	[illegible]	2,1047	0,0891	2,147	0,4287	[illegible]
GSJ 1Cavi 18	918	[illegible]	2,9243	0,1134	2,36	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 20	920	[illegible]	2,9874	0,0728	2,379	0,1579	[illegible]
GSJ 1Cavi 21	921	[illegible]	2,9258	0,0535	2,28	0,1022	[illegible]
GSJ 1Cavi 22	922	[illegible]	2,9613	0,072	2,168	0,1208	[illegible]
GSJ 1Cavi 23	923	[illegible]	2,0188	0,0688	2,378	0,1278	[illegible]
GSJ 1Cavi 24	924	[illegible]	2,7895	[illegible]	2,754	0,2752	[illegible]
GSJ 1Cavi 25	925	[illegible]	2,1087	0,1162	2,192	0,368	[illegible]
GSJ 1Cavi 26	926	[illegible]	2,9483	0,1058	2,268	0,4674	[illegible]
GSJ 1Cavi 27	927	[illegible]	2,9256	0,0626	2,322	0,3391	[illegible]
GSJ 1Cavi 28	928	0,8729	2,9388	0,0781	2,891	0,082	[illegible]
GSJ 1Cavi 29	929	[illegible]	2,1078	0,0872	2,309	[illegible]	[illegible]
GSJ 1Cavi 30	930	[illegible]	2,923	0,0784	2,2	0,1128	[illegible]
GSJ 1Cavi 31	931	[illegible]	2,967	0,0716	2,22	0,2843	[illegible]
GSJ 1Cavi 32	932	[illegible]	2,9871	0,1278	2,826	0,097	[illegible]
GSJ 1Cavi 33	933	[illegible]	2,7611	0,0817	2,864	0,0864	[illegible]
GSJ 1Cavi 34	934	[illegible]	2,9784	0,0615	2,307	0,1185	[illegible]
GSJ 1Cavi 35	935	[illegible]	2,9824	0,0633	2,853	0,0877	[illegible]
GSJ 1Cavi 36	936	[illegible]	2,9838	0,0576	2,19	0,1221	[illegible]
GSJ 1Cavi 37	937	[illegible]	2,9184	0,08	2,092	0,0819	[illegible]
GSJ 1Cavi 38	938	[illegible]	2,868	0,0869	1,923	0,0872	[illegible]
UCB GSJ 1	939	[illegible]	2,8768	0,0942	2,691	0,8961	[illegible]

FIG. 69B

	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
JCB G8J 2	940	2,9514	2,8462	0,0988	2,103	0,1936	2,7592
JCB G8J 3	941	3,2161	2,9578	0,1097	2,717	0,2148	3,0469
JCB G8J 4	942	3,1777	2,9605	0,0842	2,239	0,0631	3,0047
JCB G8J 5	943	3,1435	2,9654	0,0783	2,089	0,0634	3,0288
IG1-V192M	944	0,0622	0,1164	0,053	0,146	0,0632	0,3497
IG2-A298M_RSVF(+)FUSION-gaH	945	3,1611	3,0139	0,1081	3,606	0,3677	3,4477
IG2-T58I_A298M	946	3,0124	2,9736	0,0866	2,645	0,2778	2,8958
IG2-T58I_V192F_A298I_RSVF(+)FUSION-gaH	947	0,0912	0,0934	0,0882	0,127	0,0734	0,1561
IG2-T58I_V192M_A298I_RSVF(+)FUSION-gaH	948	0,0908	0,1119	0,0825	0,11	0,0832	0,7885
L167M-A298M	949	0,0995	0,3385	0,0492	0,345	0,0628	0,7184
L167M-L191M	950	0,0579	0,2538	0,052	0,367	0,0772	0,6506
L199I	951	2,7111	2,7454	0,4405	2,429	0,2993	2,4871
L57C-A190C	952	0,2652	0,5291	0,0661	0,894	0,0725	0,461
LG2-T58L-A298M	953	1,0703	1,5805	0,0717	0,952	0,1018	1,2219
LG2-T58M	954	2,9705	2,9905	0,1688	2,792	0,797	2,6625
LG2-T58M-A298I	955	2,9477	2,8548	0,056	2,765	0,0859	2,9108
LG2-T58M-A298L	956	2,9732	2,9793	0,0879	2,795	0,111	2,9514
LG2-V192C-INA192-193-G-A256C	957	0,0696	0,1069	0,0556	0,11	0,0852	0,3724
key f the_s_f505w_c_s509f	958	2,1277	2,6243	0,1027	1,738	0,3049	2,4114
key f the_s_f505w_s509f	959	1,3529	1,6774	0,1193	0,169	1,4000	2,3152
L59I-A298I	960	2,6436	2,6535	0,0875	2,243	0,2619	2,7531
T58M-A298M	961	2,8367	2,715	0,1073	2,712	0,1445	2,7188
V178I-L188F	962	0,886	1,2011	0,0489	0,824	0,0621	0,5012
V192F	963	0,053	0,178	0,0816	0,186	0,0608	0,318
V192F-L252A	964	0,0619	0,0803	0,1396	0,074	0,0663	0,3239
V56M-L167M-L191M	965	0,0464	0,0858	0,062	0,071	0,0549	0,4458
V56M-L167M-V230M	966	0,0521	0,1116	0,0754	0,111	0,0538	0,4302
V56M-L191F	967	0,0511	0,1618	0,1038	0,475	0,0612	0,4797
V92C-A190C	968	0,1112	0,2253	0,0782	0,103	0,09	0,3329
G8JT12	969	2,9	2,9726	0,0574	0,166	1,0864	2,5842
G8JT13	970	1,4253	1,7736	0,0572	0,144	0,0621	2,2762
G8JT14	971	2,95	2,9344	0,0737	0,422	0,1243	2,4307
G8JT15	972	1,5401	1,7335	0,0752	0,114	0,0775	2,1578
G8JT16	973	1,3708	1,6618	0,062	0,093	0,0625	2,0771
G8JT17	974	1,2053	1,8253	0,0702	0,103	0,0625	0,5
G8JT18	975	1,181	1,8089	0,1298	0,272	1,1712	0,5

FIG. 69C

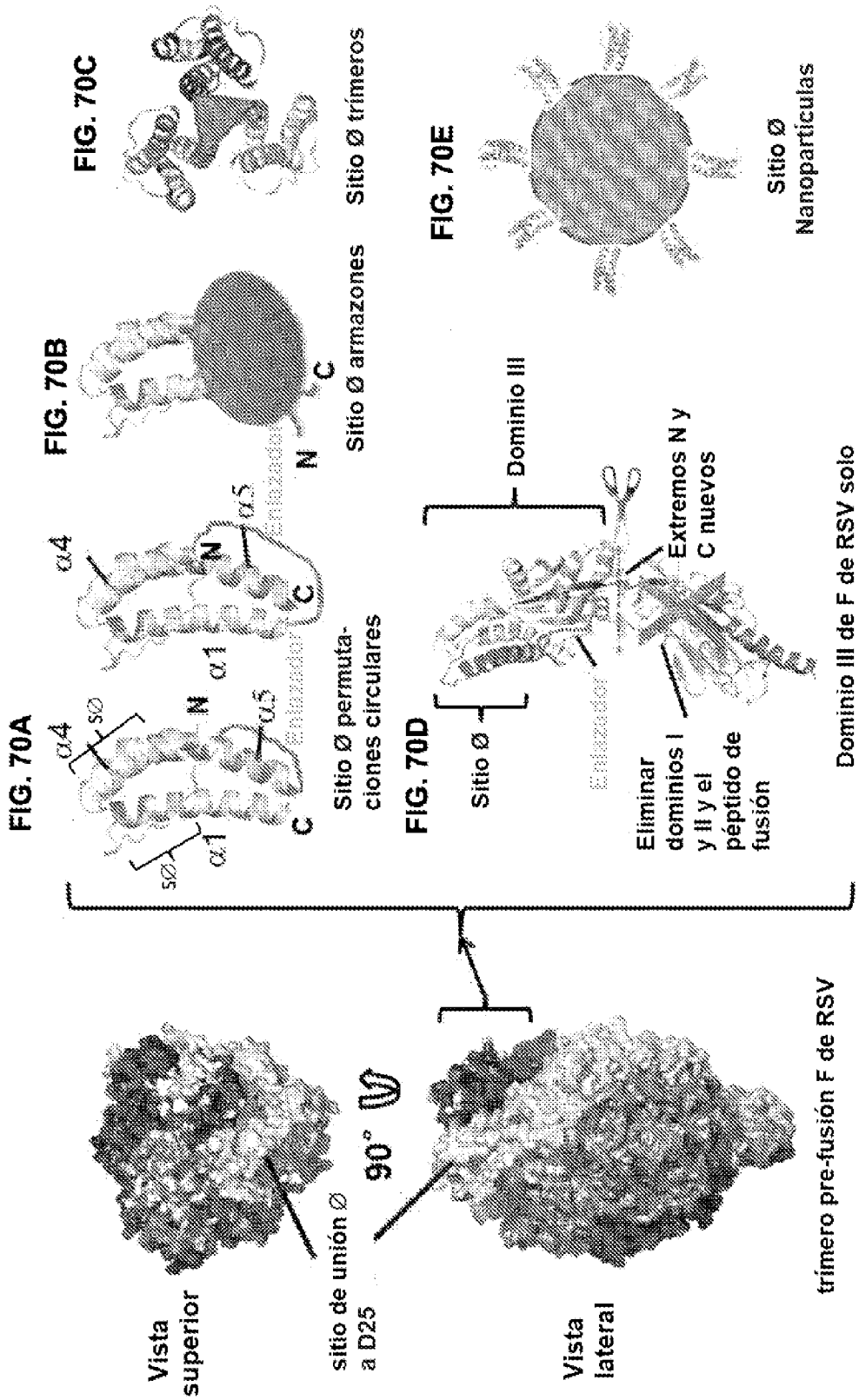
	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
G6JT19	866	0,9276	1,2456	0,0869	0,161	0,9657	1,0938
G6JT20	867	0,984	1,3047	0,0527	0,194	0,9109	1,2
G6JT21	868	1,1944	1,4919	0,1448	0,159	1,3432	1,125
G6JT22	869	1,760	2,556	0,0687	0,594	1,29	1,451
G6JT23	870	1,0262	1,3655	0,0679	0,257	1,1962	1,1264
G6JT24	871	1,5497	2,1459	0,0965	0,255	1,5013	1,2114
G6JT25	872	0,6093	1,43	0,0881	0,361	0,0439	1,2138
G6JT26	873	1,1587	1,8503	0,0532	0,421	1,6024	1,1494
G6JT27	874	1,0373	1,4579	0,0577	0,419	0,9234	1,0725
G6JT28	875	1,54	2,0962	0,0566	0,346	1,564	1,2333
G6JT29	876	1,1084	1,5343	0,0723	0,409	0,0432	1,043
G6JT30	877	1,5348	1,9793	0,1052	0,354	1,636	1,4
G6JT31	878	1,7044	2,1351	0,0569	0,284	1,1 7	1,3082
G6JT32	879	1,5762	1,9587	0,0518	0,296	1,557	1,2157
G6JT33	880	1,67	1,9659	0,0586	0,228	1,0 47	1,1987
G6JT34	881	1,5106	1,9676	0,0868	0,388	1,554	1,272
G6JT35	882	1,91	2,1785	0,0773	0,34	1,7 79	1,1236
G6JT36	883	1,6302	1,9904	0,0934	0,296	1,554	1,2217
G6JT37	884	1,4224	1,8141	0,0612	0,342	1,459	1,4074
G6JT38	885	1,1427	2,0942	0,0588	0,13	1,761	1,8457
G6JT39	886	1,0218	2,07	0,0611	0,113	1,4 47	1,435
G6JT40	887	1,5374	1,8917	0,0645	0,177	1,4654	1,2316
G6JT41	888	1,5443	1,824	0,061	0,151	1,0 14	1,1816
G6JT42	889	1,1404	2,252	0,068	0,352	1, 42	1,2477
G6JT43	890	1,7424	2,0164	0,0559	0,378	1,5 14	1,1496
G6JT44	891	1,3943	1,6933	0,0751	0,141	1,3954	1,214
G6JT45	892	1,7405	1,9854	0,0623	0,144	1,5 4	1,1747
G6JT46	893	1,7533	2,0335	0,0673	0,291	1,39	1,2506
G6JT47	894	1,7206	2,2091	0,0566	0,318	1,5 13	1,4035
G6JT48	895	1,5562	2,1432	0,0876	0,682	1,1562	1,2626
G6JT49	896	1,5 75	2,1642	0,0609	0,437	1,6 32	1,1241
G6JT50	897	1,6 51	1,888	0,0735	0,508	1,4805	1,128
G6JT51	898	2,0185	2,2042	0,056	0,662	1,5257	1,2067
G6JT52	899	1,76 7	2,2572	0,0635	0,781	1,4597	1,1 13
G6JT53	900	1,1226	1,899	0,0668	0,482	1,3792	1, 6
G6J-EP1	969	1,7847	2,1208	0,2051	0,399	1,4283	1,45 4
G6J-EP2	970	2,765	2,4107	0,1963	0,515	2,2 7	2,1339
G6J-EP3	971	0,126	0,234	0,0566	0,09	0,34	1,2032
G6J-EP4	972	0,1049	0,1701	0,0785	0,084	0,1021	0,6274
G6J-EP5	973	0,0891	0,178	0,0531	0,119	0,1454	0,5375

FIG. 69D

	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
GSJ-FP6	974	0,0634	0,0904	0,0525	0,056	0,0822	0,5962
GSJ-190P1	975	0,8047	1,1312	0,0698	0,182	0,1205	0,6337
GSJ-190P2	976	0,0573	0,0813	0,0523	0,065	0,0735	0,6404
GSJ-190P3	977	0,0739	0,1148	0,0516	0,07	0,0653	0,3209
GSJ-190P4	978	0,0924	0,093	0,0536	0,062	0,0807	0,2621
GSJ-190P5	979	[illegible]	2,8717	0,0679	2,014	0,0988	[illegible]
GSJ-190P6	980	[illegible]	2,9283	0,0687	2,401	0,4295	[illegible]
GSJ-190P7	981	[illegible]	2,9738	0,0746	2,392	0,8639	[illegible]
GSJ-190P8	982	[illegible]	2,6693	0,1063	2,27	0,175	[illegible]
GSJ-190P9	983	0,0745	0,2046	0,0878	0,394	0,0658	0,7136
GSJ-190P10	984	0,0601	0,2087	0,061	0,069	0,0568	0,4225
GSJ-190P11	985	0,0659	0,0982	0,0595	0,107	0,0783	0,3176
GSJ-190P12	986	0,0709	0,1044	0,0528	0,061	0,0885	[illegible]
GSJ-190P13	987	0,0592	0,1057	0,0475	0,053	0,0889	0,2632
GSJ-190P14	988	0,0583	0,0955	0,0468	0,058	0,0899	0,31
GSJ-190P15	989	0,0539	0,1363	0,0456	0,233	0,0685	0,3087
GSJ-190P16	990	0,0656	0,1091	0,1269	0,173	0,0781	0,492
GSJ-190P17	991	0,0583	0,1179	0,0502	0,092	0,0981	0,292
GSJ-DS1	992	0,0598	0,1286	0,0476	0,087	0,0823	0,3217
GSJ-DS2	993	0,0517	0,0942	0,0487	0,068	0,0698	0,2403
GSJ-DS3	994	0,0514	0,104	0,0714	0,094	0,0672	0,2739
GSJ-DS4	995	0,0562	0,1153	0,0542	0,08	0,0685	0,2291
GJ-3-1	996	[illegible]	2,91	0,0528	2,225	0,2481	[illegible]
GJ-3-2	997	[illegible]	2,6304	0,0587	1,948	0,0674	[illegible]
GJ-3-3	998	[illegible]	2,1696	0,0779	1,264	0,102	[illegible]
GJ-3-4	999	0,5157	1,3561	0,0551	1,246	0,168	[illegible]
GJ-3-5	1000	[illegible]	2,6132	0,0606	1,904	0,2602	[illegible]
GJ-3-6	1001	0,0791	0,772	0,046	1,231	0,0677	1,7194
GJ-3-7	1002	0,6065	1,9109	0,0827	1,623	0,0626	[illegible]
GSJ-Int-FdF-1	1003	[illegible]	2,1439	0,0867	0,295	[illegible]	[illegible]
GSJ-Int-FdF-2	1004	[illegible]	2,0912	0,0824	0,195	[illegible]	[illegible]
GSJ-Int-FdF-3	1005	[illegible]	1,8727	0,0837	0,222	[illegible]	[illegible]
GSJ-Int-FdF-4	1006	0,7215	1,0363	0,0522	0,095	0,6795	1,4721
GSJ-Int-FdF-5	1007	1,3574	1,6858	0,0585	0,118	1,1065	[illegible]
GSJ-Int-FdF-6	1008	0,7496	1,0469	0,052	0,081	0,6161	1,285
GSJ-Int-FdF-7	1009	0,6324	0,7985	0,1178	0,15	0,5634	1,3305
GSJ-Int-FdF-8	1010	1,4654	1,8779	0,0897	1,193	1,358	[illegible]
GSJ-Int-FdF-9	1011	1,4669	1,8242	0,147	0,153	1,4618	[illegible]
GSJ-Int-FdF-10	1012	[illegible]	2,0029	0,0832	0,624	[illegible]	[illegible]
GSJ-Int-FdF-11	1013	[illegible]	1,8869	0,0812	0,173	1,3835	[illegible]

FIG. 69E

	SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
GSJ-Int-FdF-12	1014	1,144	2,0524	0,0676	0,714	1,459	2,2015
GSJ-Int-FdF-13	1015	1,07	2,052	0,0534	0,094	1,4133	2,2214
GSJ-Int-FdF-14	1016	1,2368	1,6639	0,0777	0,209	1,2947	2,1521
GSJ-Int-FdF-15	1017	1,4484	2,0424	0,0531	0,18	1,2	1,992
GSJ-Int-FdF-16	1018	1,672	2,1147	0,0637	0,177	1,2024	1,9
IG1-V192M	944	0,0622	0,1164	0,053	0,146	0,0632	0,3497
IG2-R298N_R3VF(4)FdTNS-pAU	945	0,1	0,0139	0,1081	2,696	0,3677	1,6
IG2-T58I_A298M	946	3,01	2,9786	0,0866	2,645	2,7	1,9
IG2-T58I_V192F_A298I_R3VF(+)FdTNS-pAU	947	0,0912	0,0934	0,0883	0,127	0,0734	0,1541
IG2-T58I_V192M_A298I_R3VF(+)FdTNS-pAU	948	0,0908	0,1119	0,0825	0,11	0,0832	0,7880
L167m-a298m	949	0,0995	0,3355	0,0498	0,345	0,0688	0,7184
l167m-l191m	950	0,0579	0,2538	0,052	0,367	0,0772	0,6506
l190f	951	1,9466	2,7464	0,4405	2,429	0,2993	2,7
l57c-a190c	952	0,2652	0,5291	0,0661	0,094	0,0725	0,461
lg2-t58i-a298m	953	0,0703	0,6805	0,0717	0,552	0,1018	1,2218
lg2-t58m	954	3,0	2,9665	0,1685	2,792	0,797	2,8624
lg2-t58m-a298i	955	2,1471	2,8545	0,056	2,765	0,8859	2,8164
lg2-t58m-a298l	956	1,938	2,9783	0,0879	2,795	2,1538	2,8
lg2-v192c-ins192-193-g-a256c	957	0,0886	0,1069	0,0556	0,11	0,0852	0,3724
ngy f ths_a_f508w_o_a509f	958	2,1277	2,6249	0,1037	1,738	1,49	1,6185
ngy f ths_a_f508w_s509f	959	1,3529	1,6779	0,1193	0,155	1,4003	2,0199
t58i-a298i	960	2,6436	2,6533	0,0878	2,243	0,3613	1,8522
t58m-a298m	961	2,8887	2,715	0,1073	2,712	2,4639	2,8154
v179l-t189f	962	0,656	1,2011	0,0499	0,824	0,0621	0,9012
v192f	963	0,083	0,178	0,0816	0,186	0,0609	0,318
v192f-l252a	964	0,0513	0,0803	0,1358	0,074	0,0663	0,3239
v56m-l167m-l181m	965	0,0464	0,0955	0,062	0,071	0,0549	0,4468
v56m-l167m-v298m	966	0,0521	0,1118	0.0754	0,111	0,0518	0,4902
v56m-l181f	967	0,0521	0,1818	0,1008	0,475	0,0612	0,4797
v52c-s150c	968	0,1112	0,2253	0,0782	0,103	0,08	0,3329


FIG. 70A
FIG. 70B
FIG. 70C
FIG. 70D
FIG. 70E
Vista superior
sitio de unión Ø a D25
90°
Vista lateral
trímero pre-fusión F de RSV
Sitio Ø permuta-ciones circulares
Sitio Ø armazones
Sitio Ø trímeros
Sitio Ø
Eliminar dominios I y II y el péptido de fusión
Extremos N y C nuevos
Dominio III
Dominio III de F de RSV solo
Sitio Ø
Sitio Ø Nanopartículas

Inmunógenos del Sitio Antigénico ∅ de F de RSV

FIG. 71

- 249 inmunógenos expresados y evaluados antigénicamente:

  26 Monómeros del sitio ∅ permutados circularmente
  25 Monómeros del sitio ∅ con armazón permutados circularmente
  39 Sitios ∅ trimerizados permutados circularmente
  11 Nanoparticulas de monómeros del sitio ∅ permutaas circularmente
  1 Trímero del sitio ∅ permutado circularmente en nanoparticulas de ferritina
  52 Construcciones de dominio III
  12 Construcciones de dominio III trimerizadas
  18 Dímeros de dominio III permutados circularmente
  10 Dímeros de dominio III trimerizados permutados circularmente
  51 Dominio III en nanopartículas
  4 Nanopartículas del dominio III trimerizadas

- Lectura antigénica

  Unión de D25 en las semanas 0 y 1 a 4°C
  Unión de D25 tras 1 h a 60°C, 70°C, 80°C, 90°C y 100°C
  Unión de AM22 y 5C4

- Sumario de resultados de antigenicidad (ELISA ≥ 1,5):

Inmunógenos diseñados	D25 sem 0 4C	D25 sem 1 4C	D25 1h 60C	D25 1h 70C	D25 1h 80C	D25 1h 90C	D25 1h 100C	AM22 sem 2 4C	5C4 sem 0 4C
Monómeros (121)	54	49	45	49	21	9	10	54	44
Trímeros (61)	36	31	40	28	13	4	6	42	42
Monómeros en nanopartículas (63)	20	12	20	12	0	0	0	28	23
Trímeros en nanopartículas (4)	0	2	1	2	0	0	0	4	4

ES 2 981 623 T3

FIG. 72A

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Con	1,7749	[illegible]	1,3312	0,063	0,0546	0,0611	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Con	[illegible]	0,1536	0,1846	0,051	0,0596	0,0907	ND	0,315	ND	0,373
Permutación circular del sitio 0 (26)										
1027	0,984	0,7816	0,4133	[illegible]	1,2895	0,7806	ND	0,3243	0,1245	1,305
1028	0,2347	0,1646	0,0961	[illegible]	[illegible]	0,7053	ND	0,4055	0,0814	0,693
1029	0,0587	0,0618	0,0831	0,055	0,0652	0,0583	ND	0,1138	0,0692	0,077
1030	1,0318	0,6278	0,4113	0,059	[illegible]	0,4827	ND	1,1626	0,0856	0,916
1031	0,3199	0,3181	0,1695	[illegible]	[illegible]	1,4001	[illegible]	0,8191	0,0781	1,272
1032	0,0861	0,0616	0,0562	0,067	0,0791	0,065	ND	0,1363	0,0932	0,088
1033	1,3594	0,849	0,8444	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2756	0,0867	1,279
1034	0,9824	0,6065	0,1807	[illegible]	[illegible]	1,0628	[illegible]	0,1339	0,0842	1,035
1035	0,071	0,0663	0,0584	0,076	0,084	0,1459	ND	0,0943	0,1136	0,079
1036	[illegible]	[illegible]	1,3353	[illegible]	[illegible]	0,1301	ND	[illegible]	0,075	[illegible]
1037	[illegible]	1,4036	1,4878	0,434	0,3998	0,4036	ND	[illegible]	0,1077	1,397
1038	[illegible]	[illegible]	1,376	0,629	0,0524	0,333	ND	[illegible]	0,0958	1,601
1039	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2338	0,2418	ND	[illegible]	0,1113	[illegible]
1040	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0559	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0604	[illegible]
1041	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,4102	0,8312	[illegible]	[illegible]	0,0613	[illegible]
1042	0,0777	0,073	0,085	0,052	0,0859	0,0496	ND	0,2679	0,0933	0,135
1043	0,0564	0,0648	0,0617	0,051	0,0819	0,0585	ND	0,1483	0,187	0,088
1044	0,058	0,0823	0,0574	0,049	0,0847	0,0498	ND	0,0832	0,1699	0,061
1045	0,0491	0,0571	0,0561	0,046	0,074	0,0468	ND	0,1179	0,2204	0,074
1046	0,0719	0,1451	0,218	0,145	[illegible]	[illegible]	ND	[illegible]	[illegible]	0,689
1047	0,0786	0,0507	0,2224	0,051	0,1093	0,4426	ND	1,1171	0,0184	0,466
1048	0,0855	0,2685	0,0826	0,268	[illegible]	[illegible]	ND	[illegible]	0,1436	0,895
1049	0,856	[illegible]	0,3992	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,3899	0,1002	[illegible]
1050	0,0607	0,4223	0,1322	0,422	0,6564	[illegible]	ND	0,2904	0,1102	0,378
1051	0,1055	[illegible]	0,1805	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,6197	0,1127	1,466
1052	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Permutación circular con conexión de armazón (19)										
1053	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1054	0,0728	0,0645	0,0829	0,063	0,0677	0,0465	ND	0,3494	0,0902	0,166
1055	0,5403	0,3213	0,3036	0,249	0,1933	0,0526	ND	1,0104	0,1344	0,827
1056	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,304	0,1792	0,0586	ND	[illegible]	0,0816	1,235
1057	0,7436	0,3687	0,4128	0,083	0,088	0,0479	ND	0,4357	0,0715	0,396
1058	0,0633	0,0616	0,06	0,058	0,085	0,0521	ND	0,1304	0,0744	0,098
1059	0,0641	0,065	0,0717	0,054	0,0648	0,0546	ND	0,2746	0,1045	0,131
1060	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,026	0,0925	0,0498	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1061	0,0754	0,0712	0,0716	0,058	0,0682	0,0505	ND	0,2135	0,1304	0,114
1062	0,4145	0,1479	0,1602	0,133	0,1876	0,0542	ND	0,5636	0,1938	0,281
1063	0,085	0,0982	0,0661	0,069	0,0828	0,0436	ND	0,343	0,0841	0,176
1064	0,0541	0,0569	0,0632	0,052	0,1114	0,0567	ND	0,105	0,0799	0,071
1065	0,0562	0,214	0,0571	0,06	0,0848	0,0641	ND	0,1566	0,0759	0,144
1066	0,0676	0,0694	0,0621	0,061	0,1022	0,0507	ND	0,09	0,0813	0,073
1067	0,0432	0,0514	0,0566	0,049	0,0677	0,0552	ND	0,1413	0,0937	0,085
1068	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2665	0,082	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1069	0,07	0,0696	0,0856	0,054	0,0758	0,0499	ND	0,2169	0,1646	0,113
1070	0,0523	0,0527	0,0846	0,05	0,078	0,0473	ND	0,1313	0,1131	0,078
1071	0,0448	0,0484	0,0913	0,046	0,0709	0,049	ND	0,1503	0,0733	0,082

FIG. 72B

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Permutación circular de sitio 8 con trímero (39)										
1072	0,3581	0,4078	0,7423	0,481	1,1851	1,6631	ND	0,3298	0,0868	0,406
1073	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,327	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,1248	0,0861	1,434
1074	0,1014	0,2503	0,3292	0,114	0,2837	0,1077	ND	0,2319	0,0806	0,199
1075	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,4305	0,0997	[illegible]
1076	1,972	1,3076	0,0156	1,309	[illegible]	1,4035	[illegible]	0,1298	0,0862	0,914
1077	1,472	0,825	1,824	1,15	[illegible]	0,5228	ND	0,2167	0,0854	0,731
1078	0,8158	0,2163	0,8631	0,306	[illegible]	1,2613	ND	0,099	0,0767	0,207
1079	1,7333	[illegible]	[illegible]	1,409	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,4647	0,107	1,472
1080	0,4502	0,2983	0,4333	0,187	0,3934	0,1673	ND	0,218	0,0819	0,233
1081	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,3779	0,1206	[illegible]
1082	0,3473	0,3027	0,5607	0,371	0,8177	0,4034	ND	0,2757	0,0815	0,258
1083	0,4663	0,2718	0,8992	0,43	0,9627	0,3882	ND	0,0854	0,079	0,259
1084	0,3509	0,363	0,2706	0,519	0,4042	0,0582	ND	1,3032	0,0717	0,728
1085	0,1433	0,1191	0,2562	0,365	0,3129	0,0557	ND	0,9402	0,1126	0,477
1086	0,3671	0,2472	0,5003	0,581	0,4468	0,0653	ND	[illegible]	0,0853	0,813
1087	0,0741	0,0731	0,0846	0,11	0,1371	0,0512	ND	0,263	0,1618	0,149
1088	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2414	ND	[illegible]	0,0775	[illegible]
1089	1,6689	0,8883	1,2582	1,073	1,3976	0,1811	ND	[illegible]	0,078	1,171
1100	1,1363	0,5942	0,7754	0,582	0,9836	0,0765	ND	[illegible]	0,0844	1,109
1101	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1205	ND	[illegible]	0,0928	[illegible]
1102	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0829	ND	[illegible]	0,0746	[illegible]
1103	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1093	0,0562	ND	[illegible]	0,0686	[illegible]
1104	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0737	ND	[illegible]	0,0638	[illegible]
1105	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,969	0,0737	0,0519	ND	[illegible]	0,1038	[illegible]
1106	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,4528	0,0601	ND	[illegible]	0,0849	[illegible]
1107	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,5496	0,0541	ND	[illegible]	0,1179	[illegible]
1108	0,0592	0,057	0,0537	0,057	0,0462	0,1481	ND	0,6247	0,1318	0,246
1109	0,0814	0,0709	0,0718	0,071	0,1027	0,5605	ND	0,464	0,1334	0,202
1110	0,0477	0,0615	0,0575	0,062	0,1889	0,1349	ND	0,5142	0,1537	0,212
1111	0,051	0,0559	0,0564	0,056	0,0935	0,2652	ND	0,6155	0,1604	0,242
1112	0,0533	0,0513	0,0547	0,051	0,0855	0,1411	ND	0,3763	0,1488	0,226
1113	0,0713	0,0623	0,0659	0,062	0,1456	0,2845	ND	0,5906	0,1695	0,238
1114	0,0546	0,0528	0,1484	0,053	0,0823	0,7841	ND	0,7087	0,1844	0,271
1115	0,1118	0,0548	0,1034	0,055	0,0533	1,0703	ND	[illegible]	0,1999	0,709
1116	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,5106	0,0629	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1117	0,0632	0,0606	0,0677	0,061	0,0582	0,2678	ND	0,823	0,1354	0,215
1118	0,0821	0,1203	0,11	0,12	0,0819	0,091	ND	0,4587	0,109	0,236
1119	0,0581	0,0587	0,0563	0,059	0,0814	0,0524	ND	0,2831	0,1118	0,134
1120	0,0555	0,0518	0,0592	0,052	0,0595	0,0498	ND	0,2154	0,1156	0,106
Sitio 8 epítopo mínimo en un armazón (6)										
1121	0,0589	0,0565	0,0568	0,057	0,1035	0,0593	ND	0,2015	0,0829	0,105
1122	0,0567	0,0579	0,0597	0,058	0,0997	0,0629	ND	0,1782	0,1011	0,098
1123	0,0535	0,0527	0,1198	0,053	0,1266	0,0787	ND	0,1795	0,1359	0,095
1124	0,0547	0,1717	0,6961	0,172	0,0968	0,054	ND	1,0895	1,644	0,478
1125	0,0498	0,0523	0,0698	0,048	0,0803	0,0618	ND	0,823	0,1274	0,241
1126	0,0467	0,0511	0,0597	0,055	0,0846	0,0602	ND	0,1205	0,1162	0,075
Dominio III (42)										
1127	[illegible]	[illegible]	ND	[illegible]	ND	ND	ND	ND	ND	ND

FIG. 72C

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1128	1,0823	1,3526	ND	0,182	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1129	0,1101	0,1069	ND	0,067	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1130	2,2218	1,8078	ND	0,568	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1131	1,3156	0,9357	ND	0,208	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1132	0,1072	0,1626	ND	0,078	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1133	2,8[illegible]	2,8[illegible]	ND	2,[illegible]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1134	1,[illegible]	1,3663	ND	0,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1135	0,2983	0,3993	ND	0,11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1136	2,[illegible]	2,[illegible]	ND	2,[illegible]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1137	0,9978	1,1904	ND	0,28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1138	0,5312	0,7764	ND	0,305	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1139	2,5248	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	0,1128	0,0592	ND	1,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1140	0,1182	0,2949	0,1563	0,094	0,0826	0,0517	ND	1,2182	1,5278	0,536
1141	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,2226	0,0622	ND	1,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1142	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,2683	0,0936	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1143	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,8527	0,224	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1144	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,3977	0,1391	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1145	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,[illegible]	0,0581	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1146	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	1,0453	0,1286	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1147	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,13	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1148	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,7371	0,3829	ND	1,4542	2,[illegible]	2,[illegible]
1149	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,5153	0,2845	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1150	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	0,4836	0,075	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1151	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,3838	0,0682	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1152	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,4915	0,0614	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1153	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,0313	0,2322	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1154	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,2856	0,224	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1155	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	0,2005	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1156	1,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,7406	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1157	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,0701	0,1974	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1158	1,[illegible]	1,0186	0,9501	0,308	0,3739	0,0864	ND	2,[illegible]	1,[illegible]	1,344
1159	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	0,1447	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1160	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,076	1,[illegible]	0,1097	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]
1161	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,8036	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1162	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,1987	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1163	2,[illegible]	1,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	1,3027	0,2541	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1164	0,5076	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]	0,1256	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1165	2,[illegible]	1,385	2,[illegible]	1,285	0,0445	0,0983	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	1,[illegible]
1166	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,1207	0,0893	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1167	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,8664	0,0703	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1168	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,1674	0,0705	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
Dominio III con trímero (22)										
1169	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,0633	0,1167	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1170	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,3358	0,4731	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1171	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,3086	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1172	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,7138	0,1834	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1173	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	1,2607	0,1174	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]
1174	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,4101	0,8565	ND	0,8689	2,[illegible]	2,[illegible]
1175	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,3803	0,0639	ND	1,2822	2,[illegible]	2,[illegible]
1176	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]	0,4938	0,1352	ND	2,[illegible]	2,[illegible]	2,[illegible]

FIG. 72D

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1177	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2782	0,0624	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1178	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0711	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1179	[illegible]	0,0982	[illegible]	0,098	0,0688	0,0638	ND	[illegible]	[illegible]	1,057
1180	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1038	0,0698	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1181	[illegible]	1,392	[illegible]	1,392	0,2403	0,1486	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1182	[illegible]	1,3382	[illegible]	1,338	0,2278	0,1236	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1183	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0668	0,0524	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1184	0,0549	0,0533	0,0805	0,052	0,0519	0,0585	ND	0,7688	0,3922	0,252
1185	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1602	0,0551	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1186	[illegible]	1,4644	[illegible]	1,464	0,2314	0,1102	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1187	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2269	0,1206	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1188	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1278	0,0592	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1189	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1162	0,0614	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1190	0,4013	0,1884	0,7964	0,188	0,0616	0,0521	ND	[illegible]	[illegible]	0,917
Dominio III en tándem (18)										
1191	[illegible]	0,8202	[illegible]	0,82	0,0574	0,0618	ND	[illegible]	[illegible]	1,597
1192	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0691	0,0734	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1193	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0583	0,0726	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1194	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1009	0,066	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1195	1,5986	1,0687	[illegible]	1,069	0,0794	0,0514	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1196	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0762	0,0593	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1197	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0576	0,0473	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1198	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1422	0,0503	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1199	0,0822	0,0538	0,0592	0,052	0,053	0,0456	ND	0,4433	0,1375	0,183
1200	[illegible]	0,5829	[illegible]	0,588	0,2308	0,0942	ND	[illegible]	[illegible]	1,292
1201	0,0699	0,0597	0,0626	0,063	0,0479	0,0547	ND	0,2363	0,1469	0,114
1202	0,5892	0,1981	1,4615	0,198	0,0562	0,051	ND	[illegible]	[illegible]	0,974
1203	0,0815	0,0606	0,0973	0,061	0,08	0,0528	ND	0,391	0,2133	0,134
1204	0,1147	0,7387	0,3154	0,739	0,3958	0,0577	ND	[illegible]	1,2797	1,198
1205	0,0526	0,049	0,1158	0,049	0,0524	0,0464	ND	0,1603	0,1179	0,086
1206	0,0978	0,6093	0,1903	0,609	0,2338	0,0493	ND	[illegible]	0,9296	0,323
1207	0,0691	0,052	0,0893	0,052	0,0559	0,0465	ND	0,3483	0,1432	0,131
1208	0,1188	0,5431	0,2391	0,543	0,8102	0,0467	ND	[illegible]	1,5241	0,987
Dominio III en tándem con un trímero (16)										
1209	0,6033	0,0806	0,8155	0,081	0,0436	0,0936	ND	[illegible]	[illegible]	0,954
1210	1,3464	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0624	0,0769	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1211	1,2145	0,7313	[illegible]	0,731	0,0648	0,0658	ND	[illegible]	[illegible]	1,471
1212	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,0756	0,069	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1213	[illegible]	0,8101	[illegible]	0,81	0,0712	0,0731	ND	[illegible]	[illegible]	1,526
1214	[illegible]	1,4694	[illegible]	0,056	0,0612	0,049	ND	[illegible]	[illegible]	1,412
1215	0,2802	0,0612	0,348	0,061	0,0687	0,048	ND	[illegible]	[illegible]	0,845
1216	0,4583	0,1039	0,9587	0,104	0,0634	0,0464	ND	[illegible]	[illegible]	0,904
1217	0,264	0,065	[illegible]	0,065	0,0577	0,0622	ND	[illegible]	[illegible]	0,791
1218	0,4957	0,1864	0,8309	0,188	0,0491	0,0521	ND	[illegible]	[illegible]	0,956

FIG. 72E

SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
	1,7749	2,6842	1,331	0,0628	0,0546	0,0611	ND	2,795	0,8154	1,755
	1,378	0,1536	0,185	0,051	0,0596	0,0303	ND	0,915	ND	0,373
Dominio III en ferritina (45)										
1219	2,1169	2,5371	2,02	2,1169	0,069	0,0473	ND	2,7111	0,7162	1,695
1220	2,7653	2,2483	2,027	1,2483	0,3082	0,0785	ND	2,6961	1,2435	1,1611
1221	2,6715	2,1332	2,27	2,0413	0,1323	0,0531	ND	2,7286	1,178	1,557
1222	2,6641	2,5566	2,541	2,4639	0,2636	0,0577	ND	2,7538	1,1594	1,6545
1223	0,0612	0,0736	0,061	0,0736	0,0735	0,0813	ND	0,7882	0,1386	0,3118
1224	0,0565	0,0708	0,052	0,0708	0,0824	0,1425	ND	0,6484	0,1213	0,2633
1225	0,0694	0,0861	0,064	0,0861	0,0815	0,0829	ND	0,7831	0,1601	0,3218
1226	0,0584	0,0614	0,051	0,0614	0,0688	0,108	ND	0,8759	0,1134	0,3329
1227	0,055	0,0568	0,057	0,0568	0,0655	0,0654	ND	0,6022	0,1469	0,2385
1228	0,0546	0,0591	0,052	0,0591	0,062	0,1387	ND	0,3552	0,1386	0,1578
1229	0,1014	0,1232	0,144	0,1232	0,0653	0,0543	ND	1,267	0,5376	0,6011
1230	0,1051	0,1351	0,105	0,1351	0,069	0,0605	ND	1,1219	0,2913	0,4640
1231	0,0566	0,057	0,058	0,057	0,0745	0,1529	ND	0,6168	0,1501	0,2436
1232	0,056	0,061	0,066	0,061	0,076	0,1061	ND	0,5295	0,1523	0,2172
1233	0,0722	0,0868	0,063	0,0868	0,0734	0,0919	ND	0,8361	0,2803	0,3232
1234	0,0656	0,0682	0,086	0,0682	0,0703	0,0575	ND	1,164	0,3927	0,4335
1235	0,0565	0,0688	0,058	0,0688	0,0713	0,0547	ND	0,649	0,2045	0,2619
1236	0,0905	0,0981	0,1	0,0991	0,0712	0,1001	ND	1,4816	0,4601	0,5593
1237	0,1079	0,1501	0,14	0,1501	0,0741	0,0547	ND	1,5	0,5662	0,6026
1238	0,1118	0,1694	0,13	0,1694	0,0762	0,0534	ND	1,5024	0,5431	0,6137
1239	0,0961	0,0877	0,115	0,0877	0,0755	0,051	ND	1,4138	0,5617	0,5297
1240	0,074	0,0465	0,048	0,0465	0,0672	0,0468	ND	0,7411	0,2309	0,2780
1241	0,0637	0,0613	0,054	0,0613	0,0706	0,0534	ND	0,5896	0,2442	0,2378
1242	0,0801	0,0551	0,066	0,0551	0,0687	0,0501	ND	1,185	0,3432	0,4317
1243	0,0489	0,0743	0,052	0,0743	0,0702	0,0585	ND	0,4026	0,1753	0,1837
1244	0,0658	0,0898	0,088	0,0898	0,0849	0,0866	ND	1,1825	0,3617	0,4540
1245	0,0437	0,0525	0,05	0,0525	0,0899	0,0521	ND	0,356	0,198	0,1530
1246	0,0915	0,1202	0,121	0,1202	0,0835	0,0683	ND	1,4024	0,5728	0,5476
1247	0,0519	0,054	0,053	0,054	0,0869	0,056	ND	0,3511	0,2163	0,1530
1248	0,0538	0,0589	0,05	0,0589	0,085	0,0533	ND	0,6854	0,2197	0,2437
1249	0,054	0,0604	0,071	0,0604	0,0727	0,0636	ND	0,2686	0,1958	0,1238
1250	0,0498	0,052	0,05	0,052	0,0783	0,061	ND	0,4175	0,2043	0,1738
1251	0,7164	0,0893	1,281	0,0893	0,1008	0,0816	ND	2,452	0,248	0,9395
1252	0,4948	0,0911	1,178	0,0911	0,328	0,1121	ND	2,4141	0,2126	0,9321
1253	2,1	2,5763	2,45	2,0863	0,0885	0,1008	ND	2,7231	1,1	1,58
1254	2,19	2,2338	2,4	2,2338	0,0897	0,0823	ND	2,75	1,11	1,6
1255	2,6665	2,2791	2,142	2,2791	0,0871	0,0778	ND	2,7231	1,1221	1,6273
1256	2,6612	1,2219	2,18	1,2219	0,0949	0,0832	ND	2,6979	1,115	1,636
1257	2,2	0,5965	2,132	0,5965	0,1684	0,1348	ND	2,6641	0,946	1,3527
1258	2,1663	0,7303	2,15	0,7303	0,0687	0,0783	ND	2,6859	1,12	1,4432
1259	2,12	0,9592	2,02	0,9592	0,0654	0,0825	ND	2,674	1,134	1,4
1260	0,0859	0,0482	0,068	0,0482	0,0762	0,1101	ND	1,2	0,4392	0,5552
1261	0,0694	0,0545	0,075	0,0545	0,0549	0,0839	ND	1,06	0,4449	0,6575
1262	2,2015	1,03	2,198	1,0238	0,6392	0,084	ND	2,6	1,08	1,6
1263	2,2013	1,0876	2,253	1,0876	0,849	0,1029	ND	2,6859	1,12	1,6

FIG. 72F

Epítopo mínimo con trímero en ferritina (1)										
SEQ ID NO	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1264	0,0762	0,0545	0,069	0,0546	0,0842	0,2606	ND	0,5426	0,161	0,2173
Dominio III con trímero en ferritina (4)										
1265	0,5925	0,1983	0,864	0,1983	0,047	0,0535	ND	[illegible]	[illegible]	0,9442
1266	1,6402	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,097	0,0581	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1267	0,8118	0,6634	1,349	0,6634	0,0617	0,0524	ND	[illegible]	[illegible]	1,2646
1268	0,9489	[illegible]	1,533	[illegible]	0,0972	0,0859	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Epítopo mínimo en LS (2)										
1269	0,0636	0,0609	0,087	0,0609	0,0805	0,1106	ND	0,8089	0,1762	0,2108
1270	0,0575	0,0568	0,078	0,0568	0,2386	0,1619	ND	0,7801	0,1876	0,2979
1271	0,0878	0,1292	0,051	0,1292	0,0464	0,0894	ND	0,916	0,1568	0,2915
1272	0,0673	0,0553	0,06	0,0555	0,051	0,1013	ND	0,6081	0,1717	0,2376
1273	0,0685	0,0667	0,063	0,0667	0,0972	0,1069	ND	0,3102	0,152	0,1479
1274	0,0983	0,0493	0,057	0,0493	0,0716	0,1301	ND	0,4213	0,1671	0,1733
1275	1,4152	1,3084	[illegible]	1,3084	0,0853	0,0694	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1276	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,2304	0,1167	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1277	0,0487	0,0755	0,05	0,0755	0,0683	0,0482	ND	0,9456	0,1632	0,3655
1278	0,0511	0,0563	0,052	0,0563	0,0586	0,0705	ND	0,6354	0,1483	0,2493
Epítopo mínimo en ferritina (10)										
1279	0,4585	0,2412	0,316	0,2412	0,0572	0,0543	ND	[illegible]	1,4897	0,8960
1280	0,0858	0,0545	0,074	0,0545	0,0569	0,0485	ND	0,5017	0,1723	0,2036
Dominio III en LS (2)										
1281	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,0938	0,2608	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1282	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,1031	0,0552	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Dominio III en hcpt (4)										
1283	[illegible]	1,3892	[illegible]	1,2219	0,3614	0,1106	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1284	[illegible]	1,3049	1,746	0,5965	0,124	0,0564	ND	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1285	[illegible]	0,5993	[illegible]	0,7303	0,212	0,0755	ND	[illegible]	[illegible]	1,3504
1286	[illegible]	0,6031	[illegible]	0,8592	0,0736	0,0595	ND	[illegible]	[illegible]	1,4363

FIG. 73

DS-Cav1 cadena sencilla o F Prefusión Estabilizada Escindida en ferritina es Inmunogénica

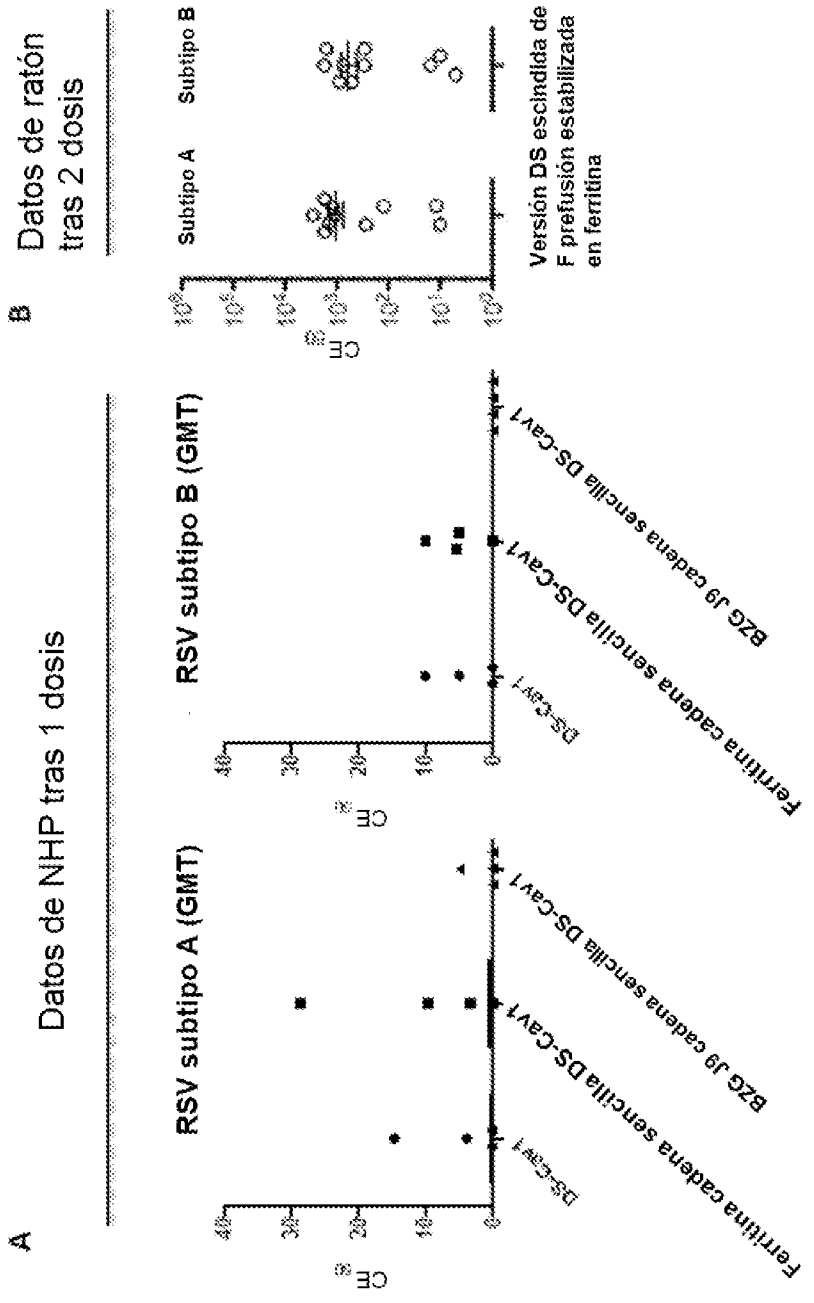


FIG. 74

Respuesta de anticuerpo es duradera en ratones después de 2 dosis

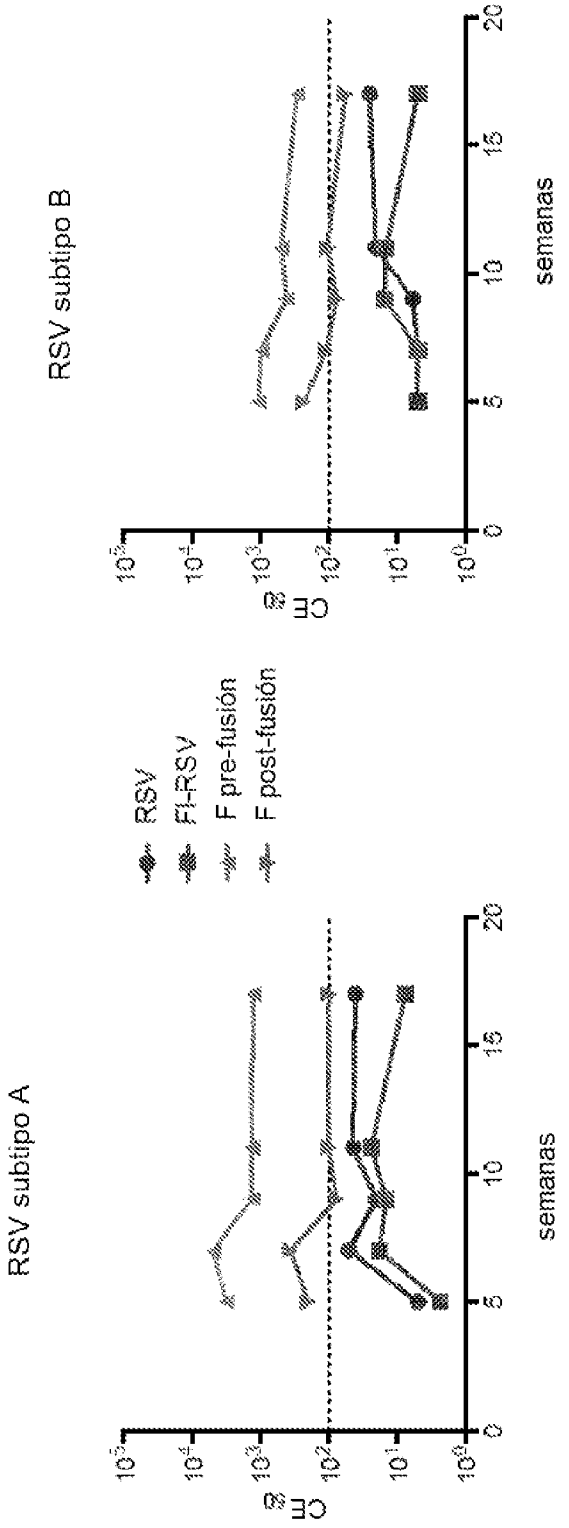


FIG. 75

Inmunización DS puede prevenir infección por RSV en ratones

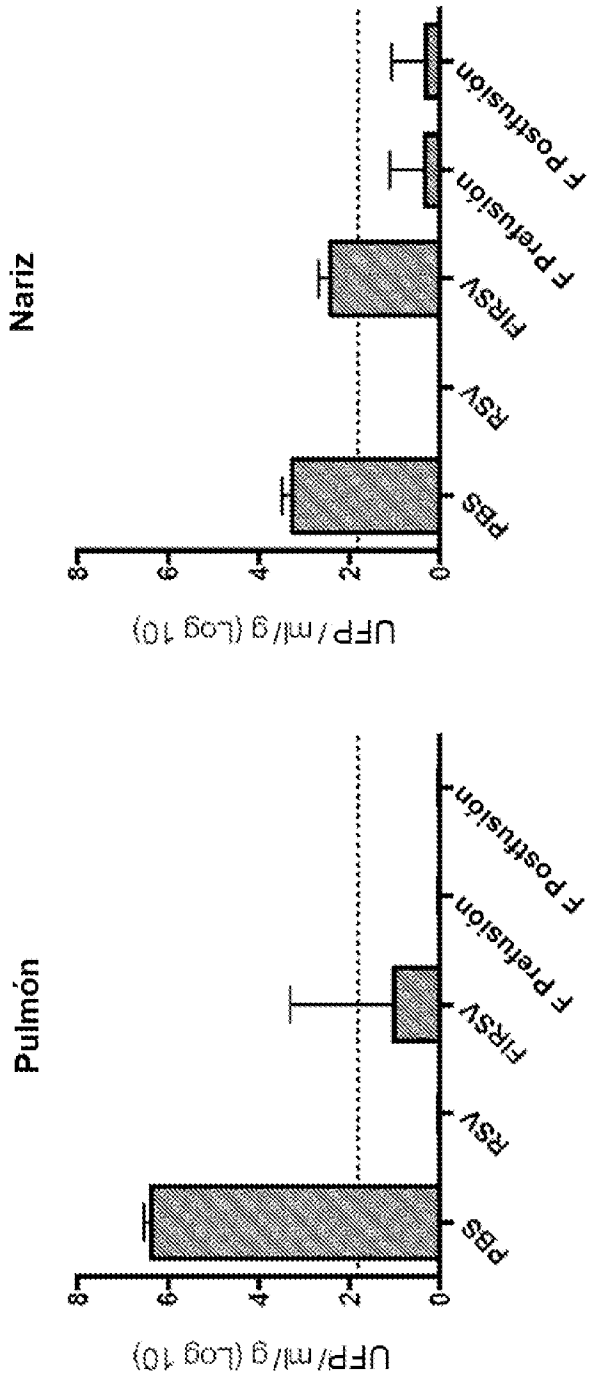


FIG. 76 Inmunización DS no induce respuestas de citoquinas Tipo 2 en ratones post-enfrentamiento

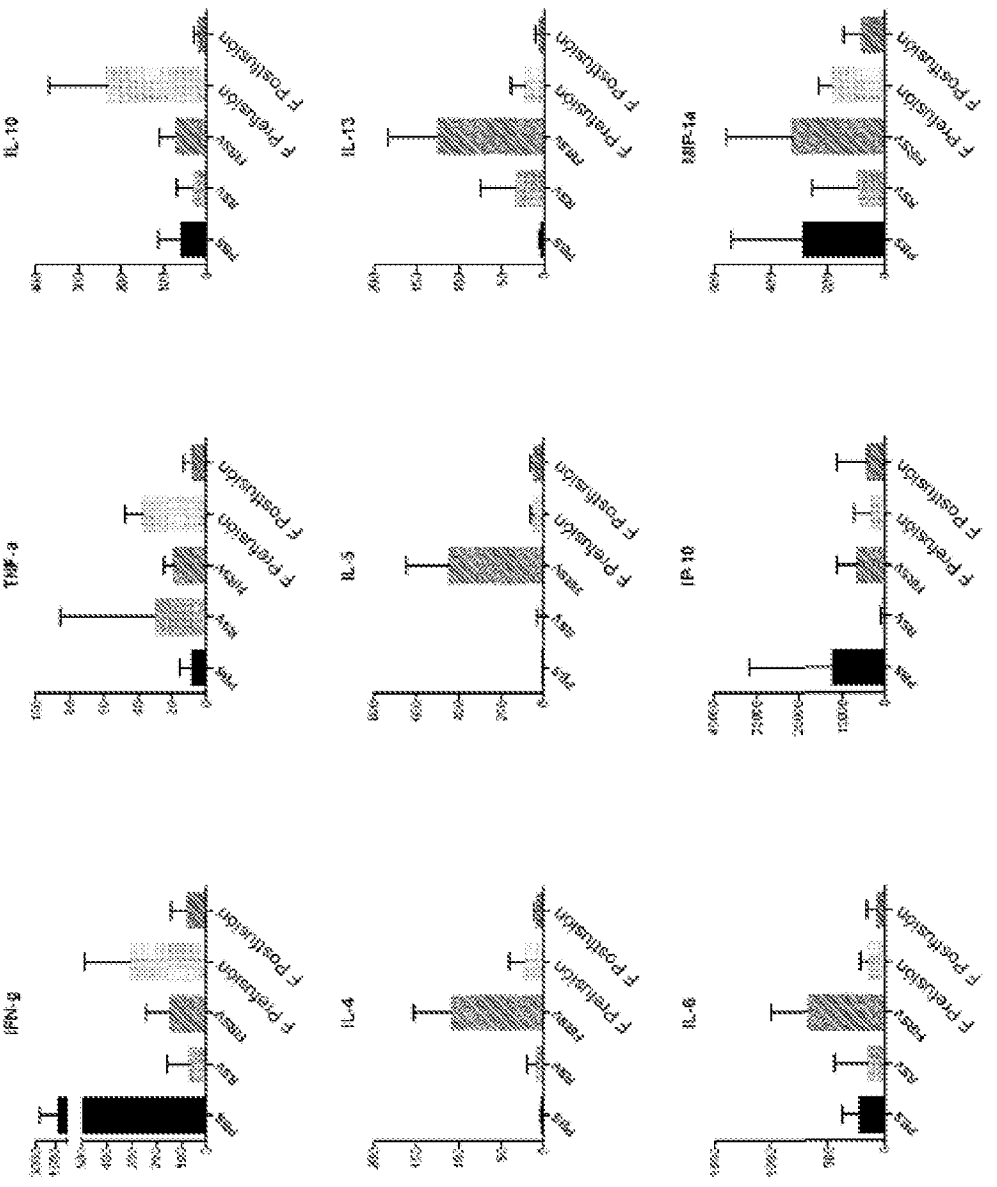


FIG. 77

La actividad neutralizante se refuerza y mantiene después de la 3ª dosis en NHP

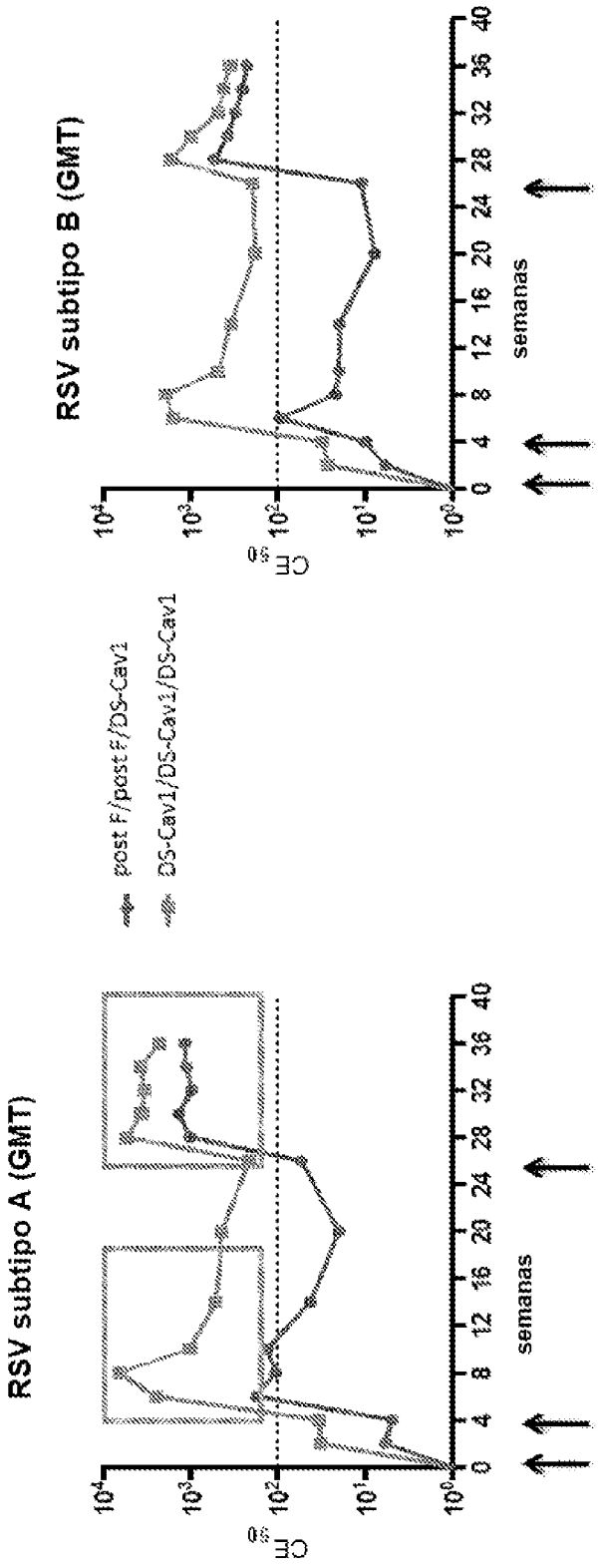


FIG. 78

DS-CAV1 puede ser formulado eficazmente en aluminio y conservar la inmunogenicidad

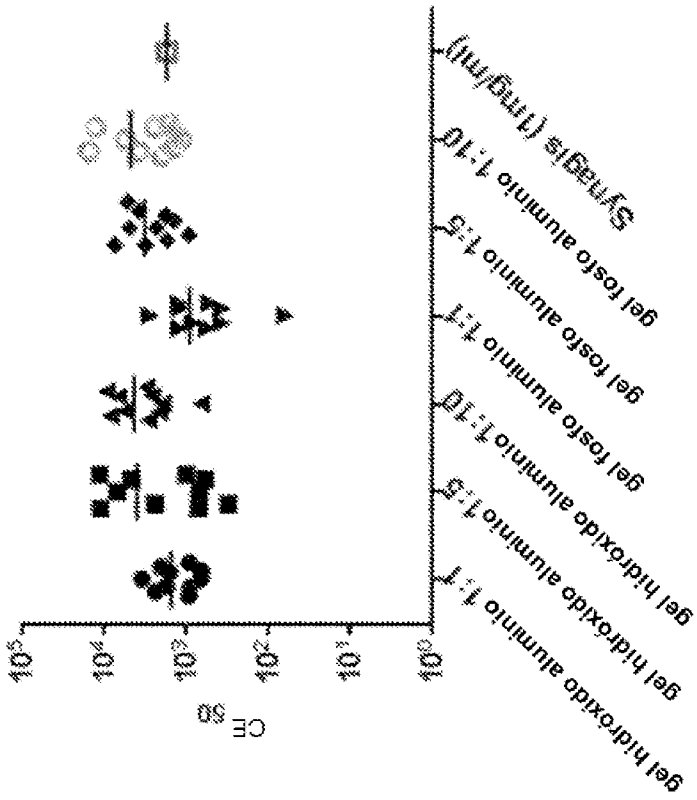


FIG. 79

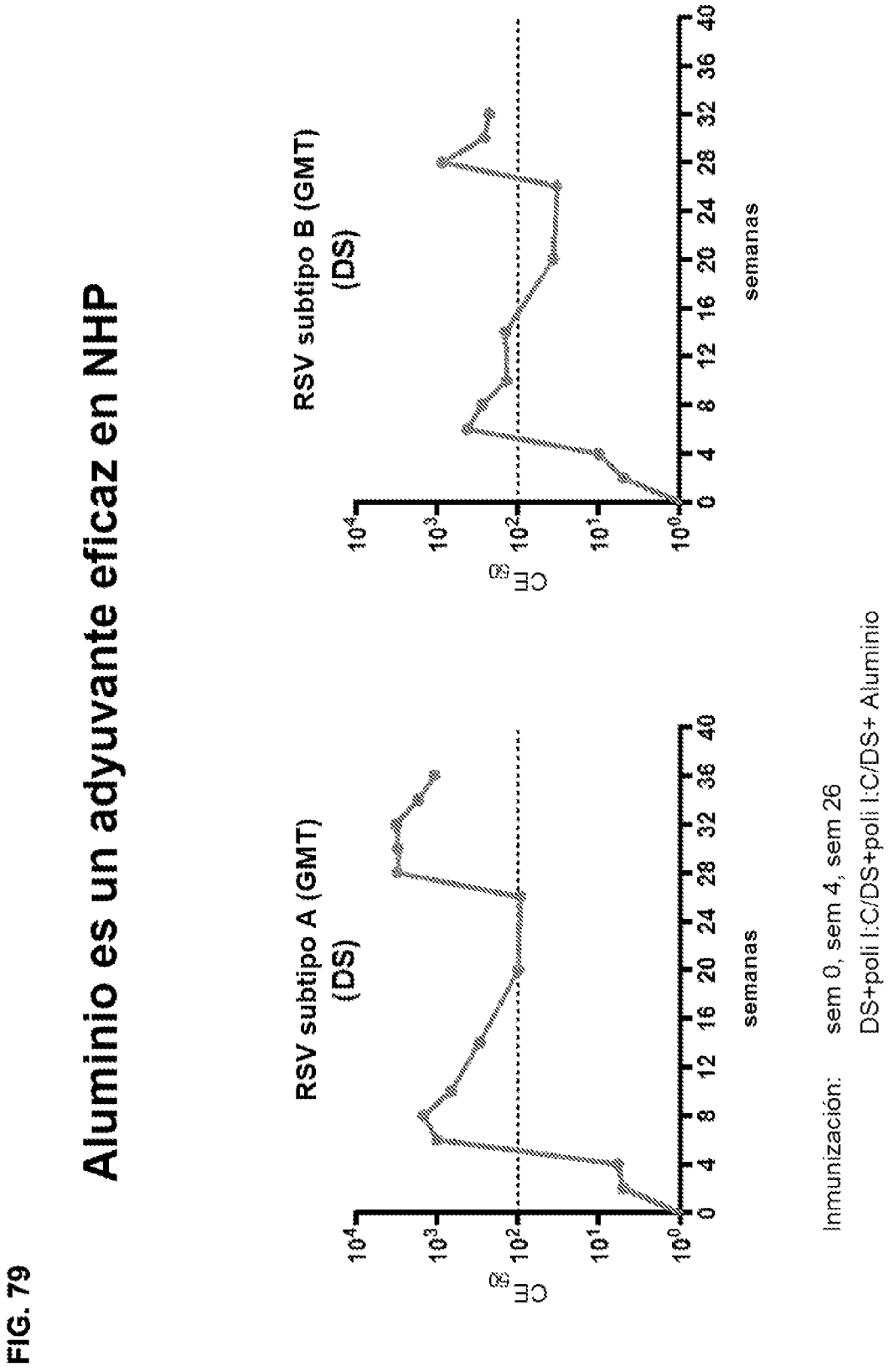

Aluminio es un adyuvante eficaz en NHP
RSV subtipo A (GMT)
(DS)
RSV subtipo B (GMT)
(DS)
CE50
semanas
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
Inmunización: sem 0, sem 4, sem 26
DS+poli I:C/DS+poli I:C/DS+ Aluminio

FIG. 80

DS-CAV1 es inmunogénico cuando se expresa de un vector basado en gen ya sea solo o como cebado para un refuerzo de proteína

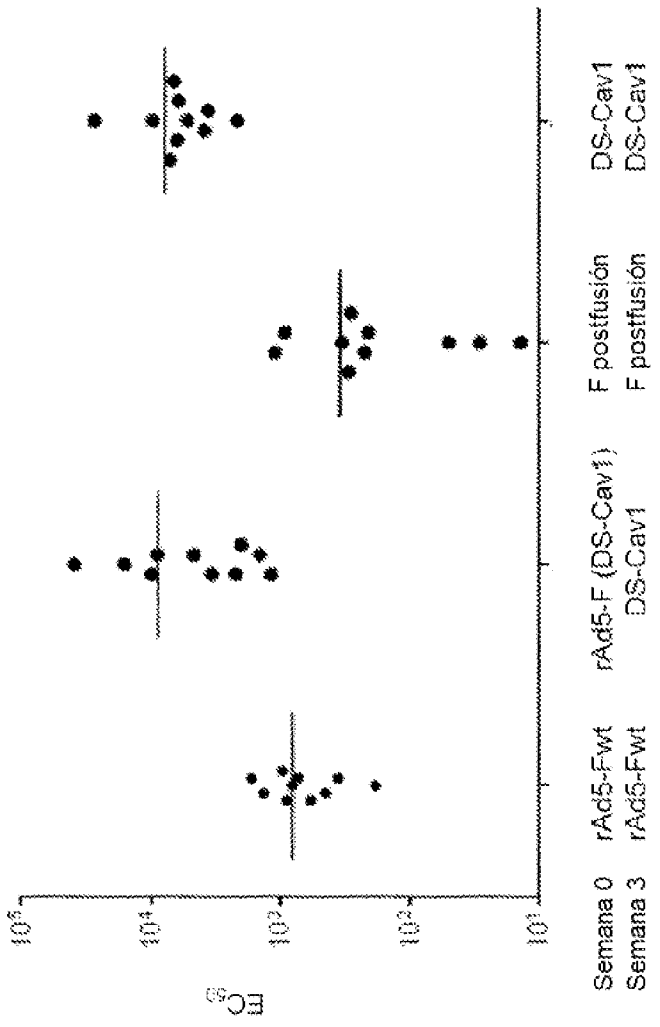
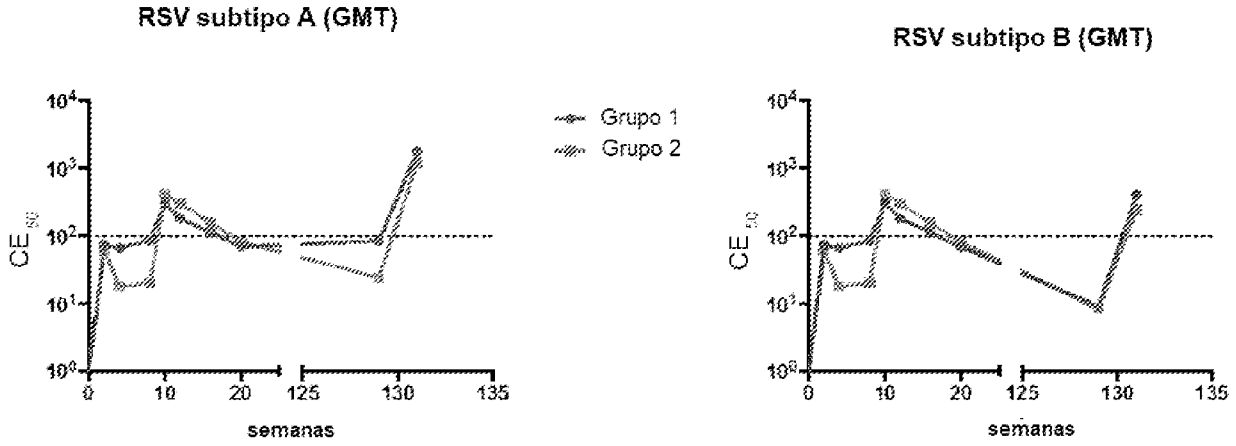


FIG. 81

DS-CAV1 F de RSV Subtipo A o B Refuerza NHP Cebado con rAd-F(A)WT



Grupo	N	Semana 0	Semana 8	Semana 120
1	6	rAd5-F	rAd5-F	DS-Cav1-A en aluminio DS-Cav1-B en aluminio
2	6	sAd7-F	rAd5-F	DS-Cav1-A en aluminio DS-Cav1-B en aluminio

FIG. 82

DS-CAV1 F de RSV subtipo A o B Refuerza
NHP Cebado con rAd-F(A)WT

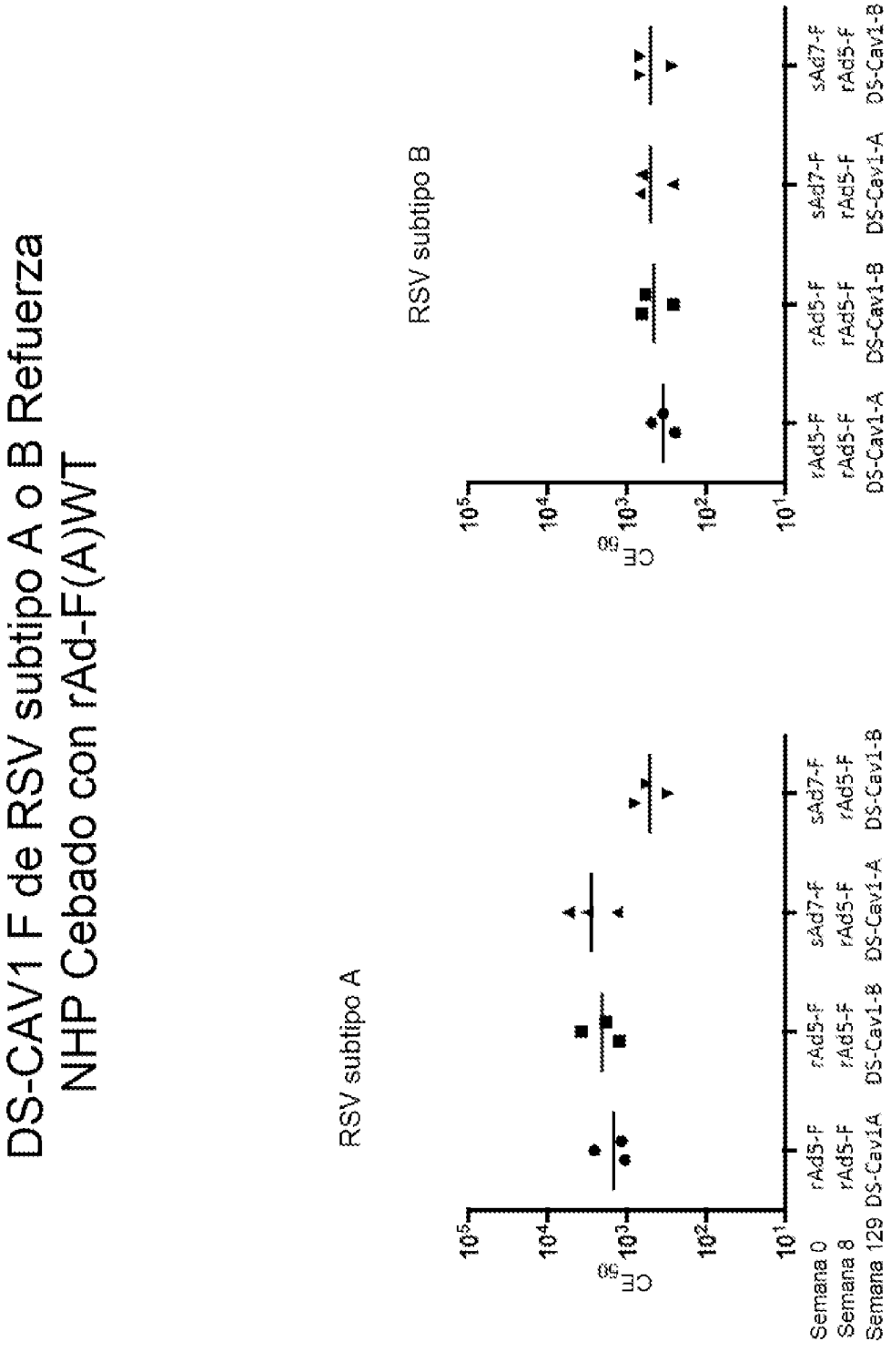


FIG. 83

Inmunización con versión DS de F subtipo A o B de prefusión estabilizada o ambos induce actividad neutralizante contra los dos subtipos

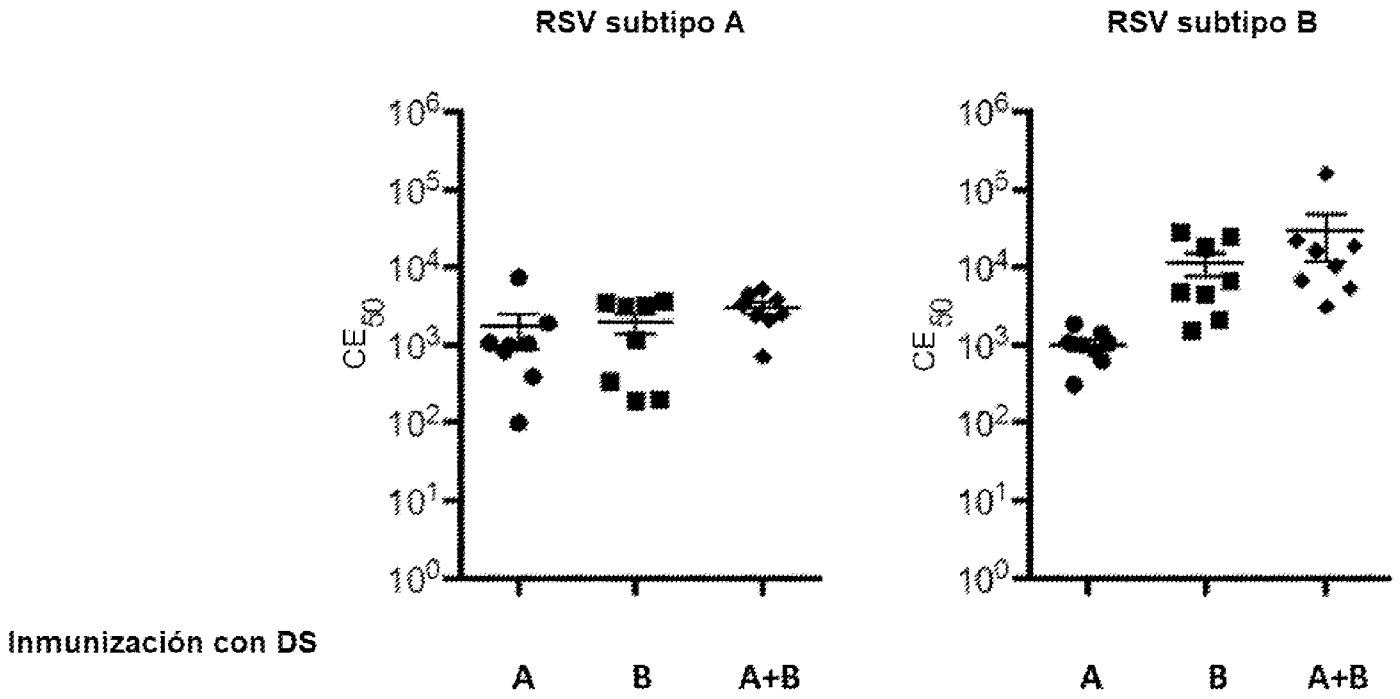


FIG. 84

Alterar la glicosilación reduce la inmunogenicidad de F prefusión estabilizada

