

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 406**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)	<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 14/005</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/155</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/295</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/107</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/127</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/14</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/135</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/45</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 16180926 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3109258**

54 Título: **Antígenos recombinantes del VSR**

30 Prioridad:

**24.12.2007 US 16524 P**  
**27.05.2008 US 56206 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.07.2019**

73 Titular/es:

**ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC (50.0%)**  
**2323 Boul. du Parc Technologique, Ste Foy**  
**Quebec G1P 4R8, CA y**  
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAUDOUX, JEAN-PIERRE;**  
**BLAIS, NORMAND;**  
**RHEAULT, PATRICK y**  
**RUELLE, JEAN-LOIUS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 719 406 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Antígenos recombinantes del VSR

**Antecedentes**

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

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

15 Se calcula que las cifras de mortalidad e infección anuales globales para el VSR son de 64 millones y 160.000 millones respectivamente. Solamente en Estados Unidos se calcula que el VSR es responsable de 18.000 a 75.000 hospitalizaciones y de 90 a 1.900 muertes al año. En climas templados, el VSR está bien documentado como una causa de epidemias anuales de comienzos del invierno de LRI agudas, incluyendo bronquiolitis y neumonía. En Estados Unidos, casi todos los niños han sido infectados con VSR hacia los dos años de edad. La tasa de incidencia de LRI asociada con VSR en niños por lo demás sanos se calculó como 37 de cada 1000 niños al año en los primeros dos años de vida (45 por cada 1000 niños al año en los lactantes menores de 6 meses de edad) y el riesgo de hospitalización como 6 de cada 1000 niños al año (por 1000 niños al año en los primeros seis meses de vida). La incidencia es mayor en los niños con enfermedad cardiopulmonar y en los que nacen de forma prematura, que constituyen casi la mitad de las hospitalizaciones relacionadas con el VSR en Estados Unidos. Los niños que experimentan una LRI más severa causada por el VSR más tarde tienen una mayor incidencia de asma infantil. Estos estudios demuestran una necesidad generalizada de vacunas para el VSR, así como el uso de las mismas, en países industrializados, en los que los costos del cuidado de los pacientes con LRI severa y sus secuelas son sustanciales. El VSR también se reconoce cada vez más como una causa importante de morbilidad enfermedades similares a la gripe en los ancianos.

20 Como se analiza, por ejemplo, en Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S. y col., "Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication", Reviews in Medical Virology vol.17 (2007) pp5-34, el desarrollo de vacunas eficaces del VSR ha resultado ser una tarea difícil y se han intentado diversos enfoques en esfuerzos para producir una vacuna para el VSR segura y eficaz y que produzca respuestas inmunes duraderas y protectoras en poblaciones sanas y en riesgo se han intentado diversos enfoques. Sin embargo, ninguna de las candidatas evaluadas hasta la fecha ha demostrado ser segura ni eficaz como una vacuna para evitar la infección por el VSR y/o reducir o prevenir la enfermedad por el VSR, incluyendo infecciones del tracto respiratorio inferior (LRI).

**Sumario**

40 La presente invención se refiere a antígenos recombinantes del virus sincitial respiratorio (VSR). De forma más específica, la presente divulgación se refiere a antígenos que incluyen una proteína F recombinante que se ha modificado para estabilizar la conformación de prefusión trimérica. Los antígenos recombinantes desvelados muestran inmunogenicidad superior y se emplean de forma particularmente favorable como componentes de composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) para la protección contra infección y/o enfermedad por VSR. También se desvelan ácidos nucleicos que codifican los antígenos recombinantes, composiciones inmunogénicas que contienen los antígenos y procedimientos para producir y usar los antígenos.

45 Específicamente, se proporciona un antígeno de virus sincitial respiratorio (VSR) recombinante que se ensambla en un trímero, que comprende un polipéptido de la proteína F soluble que comprende un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> de un polipéptido de la proteína F del VSR y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo situado en dirección C-terminal del dominio F<sub>1</sub> que estabiliza la conformación de prefusión de la proteína F.

50 También se proporcionan un ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno del VSR recombinante, una composición inmunogénica que comprende el antígeno del VSR recombinante y el uso del antígeno del VSR o el ácido nucleico recombinante en la preparación de un medicamento para tratar una infección por VSR.

**Breve descripción de las figuras**

55 La FIG. 1A es una ilustración esquemática que resalta las características estructurales de la proteína F del VSR.

La FIG. 1B es una ilustración esquemática de antígenos de Prefusión F (PreF) del VSR a modo de ejemplo.

La FIG. 2 es un gráfico de líneas que ilustra resultados representativos de análisis de fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AFF-MALS) de PreF.

5 La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de neutralización de suero humano con antígeno PreF.

Las FIGS. 4A y B son gráficos de barras que muestran titulaciones de IgG en suero provocadas en ratones como respuesta al antígeno PreF.

Las FIGS. 5A y B son gráficos de barras que ilustran titulaciones de anticuerpos de neutralización específicos para el VSR provocados por el antígeno PreF.

10 Las FIGS. 6A y B son gráficos que indican protección frente a estimulación proporcionada por el antígeno PreF del VSR en ratones.

La FIG. 7 es un gráfico que evalúa leucocitos BAL después de en inmunización y estimulación.

### **Descripción detallada**

#### **INTRODUCCIÓN**

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

25 La presente divulgación se refiere a antígenos del virus sincitial respiratorio (VSR) recombinantes que resuelven los problemas encontrados con antígenos del VSR usados anteriormente en vacunas, y mejoran las propiedades inmunológicas así como de fabricación del antígeno. Los antígenos del VSR recombinantes desvelados en el presente documento implican un análogo de la proteína Fusión (F) que incluye un polipéptido de la proteína F soluble, que se ha modificado para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F, es decir, la conformación de la proteína F ensamblada madura antes de la fusión con la membrana de la célula hospedadora. Estos análogos de la proteína F se denominan "PreF" o "antígenos PreF", por cuestiones de claridad y simplicidad. Los antígenos PreF desvelados en el presente documento se basan en el descubrimiento inesperado de que algunos análogos de la proteína F soluble que se han modificado por la incorporación de un dominio de trimerización heterólogo presentan características inmunogénicas mejoradas, y son seguros y altamente protectores cuando se administran a un sujeto in vivo.

30 En el presente documento se proporcionan algunos detalles de la estructura de la proteína F del VSR con referencia a terminología y denominaciones ampliamente aceptadas en la técnica, y se ilustran de forma esquemática en la FIG. 1A. Una ilustración esquemática de algunos antígenos PreF a modo de ejemplo se proporciona en la FIG. 1B. Los expertos en la materia entenderán que cualquier proteína F del VSR se puede modificar para estabilizar la conformación de prefusión de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por lo tanto, para facilitar la comprensión de los principios que guían la producción de antígenos PreF, algunos componentes estructurales individuales se indicarán con referencia a una proteína F a modo de ejemplo, cuyas secuencias de polinucleótidos y aminoácidos se proporcionan en las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente. De forma análoga, cuando sea aplicable, se describen antígenos de proteína G en referencia a una proteína G a modo de ejemplo, cuyas secuencias de polinucleótidos y aminoácidos se proporcionan en las SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente.

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

40 El término F0 se refiere a un precursor de la proteína F traducido de longitud completa. El polipéptido F0 se puede subdividir en un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> separados por un péptido de intervención, denominado pep27. Durante la maduración, el polipéptido F0 se somete a escisión proteolítica en dos sitios de furina situados entre F<sub>2</sub> y F<sub>1</sub> y flanqueando a Pep27. Con fines de discusión que sigue a continuación, un dominio F<sub>2</sub> incluye al menos una parte, y tanto como todos, de los aminoácidos 1-109, y una parte soluble de un dominio F<sub>1</sub> incluye al menos una parte, y hasta todos, de los aminoácidos 137-526 de la proteína F. Como se ha indicado anteriormente, estas posiciones de los aminoácidos (y todas las posiciones de los aminoácidos posteriores mencionados en el presente documento) se

dan en referencia al polipéptido precursor de la proteína F a modo de ejemplo (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.

El antígeno de prefusión F (o "PreF") es un análogo de la proteína F soluble (es decir, no unido a la membrana) que incluye al menos una modificación que estabiliza la conformación de prefusión de la proteína F, de modo que el antígeno del VSR retiene al menos un epítipo inmunodominante de la conformación de prefusión de la proteína F. El polipéptido de la proteína F soluble incluye un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> de la proteína F del VSR (pero no incluye un dominio transmembrana de la proteína F del VSR). En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio F<sub>2</sub> incluye aminoácidos 26-105 y el dominio F<sub>1</sub> incluye los aminoácidos 137-516 de una proteína F. Sin embargo, también se pueden usar partes más pequeñas, siempre y cuando se mantenga la conformación tridimensional del antígeno de PreF estabilizado. De forma análoga, también se pueden usar los polipéptidos que incluyen componentes estructurales adicionales (por ejemplo, polipéptidos de fusión) en lugar de los dominios F<sub>2</sub> y F<sub>1</sub> a modo de ejemplo, siempre y cuando los componentes adicionales no alteren la conformación tridimensional, o de otro modo influyan de forma adversa en la estabilidad, producción o procesamiento, o disminución de la inmunogenicidad del antígeno. Los dominios F<sub>2</sub> y F<sub>1</sub> están situados en una orientación de N-terminal a C-terminal diseñada para replicar el plegamiento y ensamblaje del análogo de la proteína F en la conformación de prefusión madura. Para aumentar la producción, el dominio F<sub>2</sub> puede ir precedido por un péptido señal secretor, tal como un péptido señal de la proteína F nativo o un péptido señal heterólogo elegido para aumentar la producción y secreción en las células hospedadoras en las que se va a expresar el antígeno de PreF recombinante.

Los antígenos de PreF se estabilizan (en la conformación de prefusión trimérica) mediante la introducción de una o más modificaciones, tales como la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos. Una modificación de estabilización de este tipo es la adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de estabilización heterólogo. En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio de estabilización heterólogo es un dominio de multimerización de proteína. Un ejemplo particularmente favorable de un dominio de multimerización de proteína de este tipo es un dominio de bucles superenrollados, tal como un dominio de cremallera de isoleucina que estimula la trimerización de múltiples polipéptidos que tienen un dominio de este tipo. Un dominio de cremallera de isoleucina a modo de ejemplo se representa en la SEQ ID NO: 11. Por lo general, el dominio de estabilización heterólogo está situado en posición C-terminal con respecto al dominio F<sub>1</sub>.

Opcionalmente, el dominio de multimerización está conectado con el dominio F<sub>1</sub> a través de una secuencia de engarce de aminoácidos corta, tal como la secuencia GG. El engarce también puede ser un engarce más largo (por ejemplo, que incluye la secuencia GG, tal como la secuencia de aminoácidos: GGS GGS GGS; SEQ ID NO: 14). En la técnica se conocen numerosos engarces conformacionalmente neutros que se pueden usar en este contexto sin interrumpir la conformación del antígeno de PreF.

Otra modificación de estabilización es la eliminación de un sitio de reconocimiento y escisión de furina que está situado en los dominios F<sub>2</sub> y F<sub>1</sub> en la proteína F<sub>0</sub> nativa. Uno o ambos sitios de reconocimiento de furina, situados en las posiciones 105-109 y en las posiciones 133-136 se pueden eliminar mediante delección o sustitución de uno o más aminoácidos de los sitios de reconocimiento de furina, de modo que la proteasa es incapaz de escindir el polipéptido PreF en sus dominios componentes. Opcionalmente, el péptido pep27 de intervención también se puede retirar o sustituir, por ejemplo, mediante un péptido de engarce. Además, u opcionalmente, un sitio de escisión que no es furina (por ejemplo, un sitio de metaloproteinasa en las posiciones 112-113) en proximidad con el péptido de fusión se puede retirar o sustituir.

Otro ejemplo de mutación de estabilización es la adición o delección de un aminoácido hidrófilo en un dominio hidrófobo de la proteína F. Por lo general, un aminoácido cargado, tal como lisina, se añadirá o sustituirá para un resto neutro, tal como leucina, en la región hidrófoba. Por ejemplo, un aminoácido hidrófilo se puede añadir a, o sustituir por, un aminoácido hidrófobo o neutro dentro del dominio de bucles superenrollados HRB del dominio extracelular de la proteína F. A modo de ejemplo, un resto de aminoácido cargado, tal como lisina, se puede sustituir por la leucina presente en la posición 512 de la proteína F. Como alternativa, o además, un aminoácido hidrófilo se puede añadir a, o sustituir por, un aminoácido hidrófobo o neutro dentro del dominio HRA de la proteína F. Por ejemplo, uno o más aminoácidos cargados, tales como lisina, se pueden insertar en o cerca de la posición 105-106 (por ejemplo, después del aminoácido que corresponde al resto 105 de la SEQ ID NO: 2 de referencia, tal como entre los aminoácidos 105 y 106) del antígeno de PreF). Opcionalmente, los aminoácidos hidrófilos se pueden añadir o sustituir en los dominios tanto HRA como HRB. Como alternativa, uno o más restos hidrófobos se pueden suprimir, siempre y cuando la conformación global del antígeno de PreF no se vea afectada de forma adversa.

Cualquiera y/o todas las modificaciones de estabilización se pueden usar de forma individual y/o en combinación con cualquiera de las otras modificaciones de estabilización desveladas en el presente documento para producir un antígeno de PreF. En realizaciones ilustrativas, la proteína de PreF que comprende un polipéptido que comprende un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> sin sitio de escisión de furina de intervención entre el dominio F<sub>2</sub> y el dominio F<sub>1</sub>, y con un dominio de estabilización heterólogo (por ejemplo, dominio de trimerización) situado en la posición C-terminal con respecto al dominio F<sub>1</sub>. En determinadas realizaciones, el antígeno de PreF también incluye una o más adiciones y/o sustituciones de un resto hidrófilo en un dominio HRA y/o HRB hidrófobo. Opcionalmente, el antígeno de PreF tiene una modificación de al menos un sitio de escisión que no es furina, tal como un sitio de metaloproteinasa.

Un antígeno de PreF puede incluir opcionalmente un componente de polipéptido adicional que incluye al menos una

parte inmunogénica de la proteína G del VSR. Es decir, en ciertas realizaciones, el antígeno de PreF es una proteína quimérica que incluye tanto un componente de la proteína F como de la proteína G. El componente de la proteína F puede ser cualquiera de los antígenos de PreF descritos anteriormente, y el componente de la proteína G se selecciona para que sea una parte inmunológicamente activa de la proteína G del VSR (hasta y/o incluyendo una proteína G de longitud completa). En realizaciones a modo de ejemplo, el polipéptido de la proteína G incluye los aminoácidos 149-229 de una proteína G (en la que las posiciones de los aminoácidos se designan con referencia a la secuencia de la proteína G representada en la SEQ ID NO: 4). Una persona con experiencia en la materia observará que se puede usar una parte o fragmento más pequeño de la proteína G, siempre y cuando la parte seleccionada mantenga las características inmunológicas dominantes del fragmento más grande de la proteína G. En particular, el fragmento seleccionado mantiene el epítipo inmunológicamente dominante entre aproximadamente las posiciones de los aminoácidos 184-198 (por ejemplo, los aminoácidos 180-200), y es lo suficientemente largo como para plegarse y ensamblarse en una conformación estable que presenta el epítipo inmunodominante. También se pueden usar fragmentos más largos, por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido 128 a aproximadamente el aminoácido 229, hasta la proteína G de longitud completa. Siempre y cuando el fragmento seleccionado se pliegue en una conformación estable en el contexto de la proteína quimérica, y no interfiera con la producción, procesamiento o estabilidad cuando se produce de forma recombinante en células hospedadoras. Opcionalmente, el componente de la proteína G está conectado al componente de la proteína F a través de una secuencia de engarce de aminoácidos corta, tal como la secuencia GG. El engarce también puede ser un engarce más largo (tal como la secuencia de aminoácidos: GGSGGSGGS: SEQ ID NO: 14). En la técnica se conocen numerosos engarces conformacionalmente neutros que se pueden usar en este contexto sin alterar la conformación del antígeno de PreF.

Opcionalmente, el componente de la proteína G puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos que reducen o previenen el aumento de la enfermedad viral en un modelo animal de enfermedad por VSR. Es decir, la proteína G puede incluir una sustitución de aminoácidos, de modo que cuando una composición inmunogénica que incluye el antígeno quimérico de PreF-G se administra a un sujeto seleccionado entre un modelo animal aceptado (por ejemplo, modelo de VSR de ratón), el sujeto presenta reducción o ningún síntoma de enfermedad vírica potenciada por vacuna (por ejemplo, eosinófilos, neutrófilos), en comparación con un animal de control que recibe una vacuna que incluyendo la que contiene una proteína G sin modificar. La reducción y/o prevención de enfermedad vírica potenciada por vacuna puede ser evidente cuando las composiciones inmunogénicas se administran en ausencia de adyuvante (pero no, por ejemplo, cuando los antígenos se administran en presencia de un adyuvante fuerte que induce Th1). Además, la sustitución de aminoácidos puede reducir o prevenir la enfermedad vírica potenciada por vacuna cuando se administra a un sujeto humano. Un ejemplo de una sustitución de aminoácidos adecuada es la sustitución de la asparagina en la posición 191 por una alanina (Asn → Ala en el aminoácido 191: N191A).

Opcionalmente, cualquier antígeno de PreF descrito anteriormente puede incluir una secuencia adicional que sirve como una ayuda en la purificación. Un ejemplo, es una etiqueta de polihistidina. Una etiqueta de este tipo se puede retirar del producto final si se desea.

Cuando se expresan, los antígenos de PreF se someten a plegamiento intramolecular y se ensamblan en proteína madura que incluye un multímero de polipéptidos. De forma favorable, los polipéptidos del antígeno de preF se ensamblan en un trímero que se parece a la conformación de prefusión de la proteína F del VSR, procesada, madura.

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

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

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica incluye un antígeno de PreF (tal como la realización a modo de ejemplo ilustrada por la SEQ ID NO: 6) y un segundo polipéptido que incluye un componente de la proteína G. El componente de la proteína G por lo general incluye al menos los aminoácidos 149-229 de una proteína G, aunque se pueden usar partes más pequeñas de la proteína G, tales fragmentos deberían incluir, como mínimo, el epítipo dominante inmunológico de los aminoácidos 184-198. Como alternativa, la proteína G puede incluir una parte más grande de la proteína G, tal como los aminoácidos 128-229 o 130-230, opcionalmente como un elemento de una proteína más grande, tal como la proteína G de longitud completa, o un polipéptido quimérico.

En otras realizaciones, la composición inmunogénica incluye un antígeno de PreF que es una proteína quimérica que también incluye un componente de la proteína G (tal como las realizaciones a modo de ejemplo ilustradas por las SEQ ID NOs: 8 y 10). El componente de la proteína G de un antígeno de PreF quimérico (o PreF-G) de este tipo por lo general incluye al menos los aminoácidos 149-229 de una proteína G. Como se ha indicado anteriormente, también se pueden usar fragmentos más pequeños o más grandes (tales como los aminoácidos 129-229 o 130-230) de la proteína G, siempre y cuando se mantengan los epítomos inmunodominantes, y la conformación del antígeno de PreF-G no se vea influida de forma adversa.

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también pueden incluir al menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto del VSR. Por ejemplo, el organismo patógeno es un virus distinto del VSR, tal como virus de la Parainfluenza (PIV), sarampión, hepatitis B, poliovirus, o virus de la gripe. Como alternativa, el organismo patógeno puede ser una bacteria, tal como difteria, tétanos, pertussis, *Haemophilus influenzae*, y *Pneumococcus*.

Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de los antígenos de PreF (incluyendo antígenos de PreF-G) también son una característica de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico que codifica el antígeno de PreF del ácido nucleico se optimiza para expresión en un hospedador seleccionado (tal como células CHO, otras células de mamífero, o células de insecto). Por consiguiente, los vectores, incluyendo vectores de expresión (que incluyen vectores de expresión procariotas y eucariotas) son una característica de la presente divulgación. De forma análoga, las células hospedadoras que incluyen tales ácidos nucleicos, y vectores, son una característica de la presente divulgación. Tales ácidos nucleicos también se pueden usar en el contexto de composiciones inmunogénica para administración a un sujeto para provocar una respuesta inmune específica para el VSR.

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

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

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

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

## TÉRMINOS

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

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

Los términos en singular "un", "uno", y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro. De forma análoga, el término "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto no indique

claramente de otro modo. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Se debe entender adicionalmente que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, dados para ácidos nucleicos o polipéptido son aproximados, y se proporcionan para descripción. Además, se pretende que las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, sean aproximadas. Por lo tanto, cuando se indica que una concentración es al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que se entienda que la concentración es al menos aproximadamente (o "aproximadamente" o "~") 200 pg.

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

El virus sincitial respiratorio (VSR) es un virus patógeno de la familia Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género Pneumovirus. El genoma del VSR es una molécula de ARN de sentido negativo, que codifica 11 proteínas. Una asociación estrecha del genoma del ARN con la proteína N viral forma una nucleocápside encuentra dentro de la envoltura viral. Se han descrito dos grupos de cepas del VSR humano, los grupos A y B, basándose en las diferencias de antigenicidad de la glicoproteína G. Hasta la fecha se han aislado numerosas cepas del VSR. Algunas cepas a modo de ejemplo indicadas con número de referencia en GenBank y/o EMBL se pueden encontrar en el documento WO2008114149, que desvela las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de las proteínas F y G del VSR adecuadas para uso en antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G quiméricos), y en combinaciones con antígenos PreF. Probablemente se van a aislar algunas cepas de VSR adicionales, y están incluidas dentro del género del VSR. De forma análoga, el género del VSR incluye variantes que se producen a partir de origen natural (por ejemplo, cepas identificadas previa o posteriormente) mediante deriva genética, o síntesis artificial y/o recombinación.

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

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

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

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

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

de una dirección N-terminal a C-terminal, definida por la orientación de los restos amino y carboxi de los aminoácidos individuales. Los polipéptido se traducen desde el extremo N o amino hacia el extremo C o carboxi.

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

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

20 Un ácido nucleico "recombinante" es uno que tiene una secuencia que no tiene origen natural o tiene una secuencia que se fabrica mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial se puede realizar mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Una proteína "recombinante" es una que esta codificada por un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante), que se ha introducido en una célula hospedadora, tal como una célula bacteriana o eucariota. El ácido nucleico se puede introducir en un vector de expresión que tiene señales capaces de expresar la proteína codificada por el ácido nucleico introducido o el ácido nucleico se puede integrar en el cromosoma de la célula hospedadora.

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

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

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

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

que se une de forma específica mediante un anticuerpo (o molécula receptora de linfocitos B).

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

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

Una "respuesta inmune" es una respuesta de una célula del sistema inmune, tal como un linfocito B, linfocito T, o monocito, a un estímulo. Una respuesta inmune puede ser una respuesta de linfocitos B, que da como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos de neutralización específicos de antígeno. Una respuesta inmune también puede ser una respuesta de linfocitos T, tal como una respuesta de CD4<sup>+</sup> o una respuesta de CD8<sup>+</sup>. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno en particular (es decir, una "respuesta específica de antígeno"). Si el antígeno se deriva de un patógeno, la respuesta específica del antígeno es una "respuesta específica de patógeno". Una "respuesta inmune protectora" es una respuesta inmune que inhibe una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce la infección por un patógeno, o disminuye síntomas (incluyendo muerte) que resultan de la infección por el patógeno. Una respuesta inmune protectora se puede medir, por ejemplo, mediante la inhibición de la replicación viral o formación de placas en un ensayo de reducción de placas o ensayo de neutralización de ELISA, o midiendo la resistencia a estimulación de patógenos *in vivo*.

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

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

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

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

El término "reduce" es un término relativo, de modo que un agente reduce una respuesta o afección si la respuesta o afección disminuye de forma cuantitativa después de la administración del agente, o si disminuye después de la administración del agente, en comparación con un agente de referencia. De forma análoga, el término "previene" no significa necesariamente que un agente elimine completamente la respuesta o afección, siempre y cuando se elimine al menos una característica de la respuesta o afección. Por lo tanto, una composición inmunogénica que renuncie previene una infección o una respuesta, tal como una respuesta patológica, por ejemplo, enfermedad viral potenciada por vacuna, puede, eliminar, pero no necesariamente de forma total, una infección o respuesta, siempre

y cuando la infección o respuesta sería disminuida de forma mensurable, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 50 %, tal como en al menos aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o incluso en aproximadamente un 90 % de (es decir, en un 10 % o inferior a) la infección o respuesta en ausencia del agente, o en comparación con un agente de referencia.

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

#### ANTÍGENOS DE PreF

10 En la naturaleza, la proteína F del VSR se expresa como un solo precursor de polipéptido con una longitud de 574 aminoácidos, denominado F0. *In vivo*, F0 se oligomeriza en el retículo en lo plasmático y se procesa de forma proteolítica por una furina proteasa en dos secuencias consenso de furina conservadas (sitios de escisión de furina), RARR<sup>109</sup> (SEQ ID NO: 15) y RKRR<sup>136</sup> (SEQ ID NO: 16) para generar un oligómero que consiste en dos fragmentos unidos por disulfuro. El más pequeño de estos fragmentos se denomina F2 y se origina desde la parte N-terminal del precursor de F0. Los expertos en la materia reconocerán que las abreviaturas F0, F1 y F2 se denominan normalmente F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> en la bibliografía científica. El fragmento F1 C-terminal más grande ancla la proteína F en la membrana a través de una secuencia de aminoácidos hidrófobos, que son adyacentes a una cola hito plasmática de 24 aminoácidos. Tres dímeros F2-F1 se asocian para formar una proteína F madura, que adopta una conformación prefusogénica ("prefusión") metaestable que se pone en funcionamiento para experimentar un cambio conformacional después de contacto con una membrana de célula diana. Este cambio conformacional expone a una secuencia hidrófoba, conocida como el péptido de fusión, que se asocia con la membrana de la célula hospedadora y estimula la fusión de la membrana del virus, o una célula infectada, con la membrana de la célula diana.

15 El fragmento F1 contiene al menos un dos dominios de repetición heptad, denominados HRA y HRB, y situados en proximidad a los dominios de ancla de péptido de fusión y transmembrana, respectivamente. En la conformación de prefusión, el dímero F2-F1 forma una estructura de cabeza y tallo globular, en la que los dominios HRA están en una conformación segmentada (extendida) en la cabeza globular. Por el contrario, los dominios HRB forman un tallo de bucles superenrollados de tres hebras que se extienden desde la región de la cabeza. Durante la transición de la prefusión a las conformaciones postfusión, los dominios HRA se colapsan y se ponen en proximidad con los HRB para formar un haz de seis hélices anti-paralelas. En el estado de postfusión, el péptido de fusión y dominios transmembrana se yuxtaponen para facilitar la fusión de la membrana.

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

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

30 En primer lugar, un dominio de estabilización heterólogo se puede colocar en el extremo C-terminal de la construcción para sustituir la membrana ese ancla al dominio del polipéptido F0. Este dominio de estabilización se predice para compensar la inestabilidad de HRB, para ayudar a estabilizar al confórmero de prefusión. En realizaciones a modo de ejemplo, el dominio de estabilización heterólogo es un dominio de multimerización de proteínas. Un ejemplo particularmente favorable de un dominio de multimerización de proteínas de este tipo es un dominio de trimerización. Algunos dominios de trimerización a modo de ejemplo se pliegan en bucles superenrollados que estimulan el ensamblaje en trímeros de múltiples polipéptidos que tienen tales dominios de bucles superenrollados. Un ejemplo favorable de un dominio de trimerización es una cremallera de isoleucina. Un dominio de cremallera de isoleucina a modo de ejemplo es la variante de isoleucina GCN4 de levadura modificada

por ingeniería descrita en Harbury y col., Science 262: 1401-1407 (1993). La secuencia de un dominio de cremallera de isoleucina adecuado se representa por la SEQ ID NO: 11, aunque algunas variantes de esta secuencia que retienen la capacidad para formar dominio de estabilización de bucles superenrollados son igualmente adecuadas. Algunos dominios de trimerización de bucles superenrollados de estabilización alternativos incluyen: TRAF2 (N.º de Referencia en GENBANK® Q12933 [gi:23503103]; aminoácidos 299-348); Thrombospondina 1 (N.º de Referencia PO7996 [gi:135717]; aminoácidos 291-314); Matrilina-4 (N.º de Referencia O95460 [gi:14548117]; aminoácidos 594-618); CMP (matrilina-1) (N.º de Referencia NP\_002370 [gi:45051111]; aminoácidos 463-496); HSF1 (N.º de Referencia AAX42211 [gi:61362386]; aminoácidos 165-191); y Cubilina (N.º de Referencia NP\_001072 [gi:4557503]; aminoácidos 104-138. Se espera que un dominio de trimerización adecuado dé como resultado el ensamblaje de una parte sustancial de la proteína expresada en trímeros. Por ejemplo, al menos un 50 % del polipéptido de PreF recombinante que tiene un dominio de trimerización se ensamblará en un trímero (por ejemplo, cómo se evalúa con AFF-MALS). Por lo general, al menos un 60 %, más favorablemente al menos un 70 %, y de forma más deseada al menos un aproximadamente un 75 % o más del polipéptido expresado existe como un trímero.

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

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

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

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

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

En la selección de los dominios F<sub>2</sub> y F<sub>1</sub> de la proteína F, un experto en la materia reconocerá que no es estrictamente necesario incluir todo el dominio F<sub>2</sub> y/o F<sub>1</sub>. Por lo general, las consideraciones conformacionales tienen importancia cuando se selecciona una subsecuencia (o fragmento) del dominio F<sub>2</sub>. Por lo tanto, el dominio F<sub>2</sub> por lo general incluye una parte del dominio F<sub>2</sub> que facilita el ensamblaje y la estabilidad del polipéptido. En ciertas variantes a modo de ejemplo, el dominio F<sub>2</sub> incluye los aminoácidos 26-105. Sin embargo, también son posibles algunas variantes que tienen modificaciones menores de longitud (mediante adición, o delección de uno o más aminoácidos).

Por lo general, al menos una subsecuencia (o fragmento) del dominio F<sub>1</sub> se selecciona y diseña para mantener una

conformación estable que incluye epítomos inmunodominantes de la proteína F. Por ejemplo, por lo general es deseable seleccionar una subsecuencia del dominio del polipéptido F1 que incluya epítomos reconocidos por anticuerpos de neutralización en las regiones de los aminoácidos 262-275 (neutralización con palivizumab) y 423-436 (MAB ch101F de Centocor). Además, es deseable incluir epítomos de linfocitos T, por ejemplo, en la región de los aminoácidos 328-355. Lo más habitualmente, como una sola parte contigua de la subunidad F1 (por ejemplo, aminoácidos transmembrana 262-436) pero los epítomos se podrían retener en una secuencia sintética que incluyera estos epítomos inmunodominantes como elementos discontinuos ensamblados en una conformación estable. Por lo tanto, un polipéptido del dominio F<sub>1</sub> comprende al menos aproximadamente los aminoácidos 262-436 de un polipéptido de la proteína F del VSR. En un ejemplo limitante proporcionado en el presente documento, el dominio F<sub>1</sub> comprende los aminoácidos 137 a 516 de un polipéptido de la proteína F nativa. Un experto en la materia reconocerá que se pueden usar subsecuencias más cortas adicionales de acuerdo con el criterio del experto.

Cuando se selecciona una subsecuencia del dominio F<sub>2</sub> o del dominio F<sub>1</sub> (o como se discutirá a continuación con respecto al componente de la proteína G de ciertos antígenos de PreF-G), además de consideraciones conformacionales, puede ser deseable elegir secuencias (por ejemplo, variantes, subsecuencias, y similares) basándose en la inclusión de epítomos inmunogénicos adicionales. Por ejemplo, los epítomos de linfocitos T adicionales se pueden identificar usando motivos de ancla u otros procedimientos, tales como determinaciones de red neuronal o polinomiales, conocidos en la técnica, véase, por ejemplo RANKPEP (disponible en la world wide web en: [mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html](http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html)); ProPredI (disponible en la world wide web en: [imtech.res.in/raghava/propredI/index.html](http://imtech.res.in/raghava/propredI/index.html)); Bimas (disponible en la world wide web en: [www.bimas.dcrn.nih.gov/molbi/hla\\_bind/index.html](http://www.bimas.dcrn.nih.gov/molbi/hla_bind/index.html)); y SYFPEITH (disponible en la world wide web en: [syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm](http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm)). Por ejemplo, para determinar el "umbral de unión" de péptidos se usan algoritmos, y para seleccionar aquellos con puntuaciones que les dan una probabilidad elevada de unión a MHC o anticuerpo a una cierta afinidad. Los algoritmos se basan ya sea en los efectos en la unión a MHC de un aminoácido en particular en una posición en particular, los efectos en la unión anticuerpo de un aminoácido en particular en una posición en particular, o los efectos en la unión de una sustitución en particular en un péptido que contiene motivo. Dentro del contexto de un péptido inmunogénico, un "resto conservado" es uno que aparece con una frecuencia significativamente más elevada de lo que se podría esperar mediante distribución aleatoria en una posición en particular en un péptido. Los restos de ancla son restos conservados que proporcionan un punto de contacto con la molécula de MHC. Los epítomos de linfocitos T identificados con tales procedimientos predictivos can se pueden confirmar por medición de su unión a una proteína de MHC específica y por su capacidad para estimular los linfocitos T cuando se presentan en el contexto de la proteína de MHC.

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

Opcionalmente, el antígeno de PreF puede incluir componentes inmunogénicos adicionales. En ciertas realizaciones particularmente favorables, el antígeno de PreF incluye un componente antigénico de la proteína G del VSR. Las proteínas quiméricas a modo de ejemplo que tienen un componente de PreF y G incluyen las siguientes PreF\_V1 (representadas por las SEQ ID NOs: 7 y 8) y PreF\_V2 (representadas por las SEQ ID NOs: 9 y 10).

En los antígenos de PreF-G, una parte antigénica de la proteína G (por ejemplo, una proteína G truncada, tal como los restos de aminoácidos 149-229) se añade en el extremo C-terminal de la construcción. Por lo general, el componente de la proteína G se une al componente de la proteína F a través de una secuencia de engarce flexible. Por ejemplo, en el diseño de PreF\_V1 a modo de ejemplo, la proteína G se une al componente de PreF mediante un conector -GGSGGSGGS- (SEQ ID NO: 14). En el diseño de PreF\_V2, el engarce es más corto. En lugar de tener el engarce -GGSGGSGGS- (SEQ ID NO: 14), PreF\_V2 tiene 2 glicinas (-GG-) por engarce.

Cuando está presente, el dominio del polipéptido de la proteína G puede incluir toda o parte de una proteína G seleccionada entre cualquier cepa A del VSR o B del VSR. En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, la proteína G es (o es idéntica en un 95 % a) la proteína G representada por la SEQ ID NO: 4. Algunos ejemplos adicionales de secuencias de la proteína G adecuadas se pueden encontrar en el documento WO2008114149.

El componente del polipéptido de la proteína G se selecciona para que incluya al menos una subsecuencia (o fragmento) de la proteína G que mantiene el epítomo(s) inmunodominante de linfocitos T, por ejemplo, en la región de los aminoácidos 183-197, tal como fragmentos de la proteína G que incluyen los aminoácidos 151-229, 149-229, o 128-229 de una proteína G nativa. En una realización a modo de ejemplo, el polipéptido de la proteína G es una

- subsecuencia (o fragmento) de un polipéptido de la proteína G nativa que incluye todos o parte de los restos de aminoácidos 149 a 229 de un polipéptido de la proteína G nativa. Alguien con experiencia en la materia observará rápidamente que también se pueden usar partes más largas o más cortas de la proteína G, siempre y cuando la parte seleccionada no desestabilice o interrumpa de forma conformacional la expresión, plegamiento o procesamiento del antígeno de PreF-G. Opcionalmente, el dominio de la proteína G incluye una sustitución de aminoácidos en la posición 191, que previamente se ha mostrado que está implicado en la reducción y/o prevención del aumento de enfermedades caracterizadas por eosinófilos asociados con vacunas del VSR inactivadas con formalina. Una descripción minuciosa de las características de las proteínas G de origen natural y sustituidas (N191A) se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2005/0042230.
- Por ejemplo, con respecto a la selección de secuencias correspondientes a cepas de origen natural, uno o más de los dominios puede corresponder, en secuencia, con una cepa A o B del VSR, tal como los aislados de laboratorio comunes denominados A2 o Largo, o cualquier otra cepa o aislado de origen natural (como se ha desvelado en el documento WO2008114149 mencionado anteriormente). Además de tales variantes de origen natural y aisladas, algunas variantes modificadas por ingeniería que comparten similitud de secuencias con las secuencias mencionadas anteriormente también se pueden usar en el contexto de antígenos de PreF (incluyendo PreF-G). Los expertos en la materia entenderán que la similitud entre el polipéptido del antígeno PreF (y secuencias de polinucleótidos como se describe a continuación), como para el polipéptido (y secuencias de nucleótidos en general), se puede expresar en términos de la similitud entre las secuencias, denominada de otro modo identidad de secuencias. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos de porcentaje de identidad (o similitud); cuanto más elevado es el porcentaje, más similares son las estructuras primarias de las dos secuencias. En general, cuanto más similares son las estructuras primarias de dos secuencias de aminoácidos (o polinucleótidos), más similares son las estructuras de orden superior resultantes del plegamiento y ensamblaje. Algunas variantes de secuencias de polipéptido de PreF (y polinucleótidos) tienen por lo general una o un número más pequeño de deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos pero sin embargo comparten un porcentaje muy elevado de sus secuencias de aminoácidos, y por lo general sus secuencias de polinucleótidos. De forma más importante, las variantes retienen los atributos estructurales, y por lo tanto, conformacionales de las secuencias de referencia desveladas en el presente documento.
- Algunos procedimientos para determinar la identidad de secuencias se conocen bien en la técnica, y son aplicables a polipéptidos del antígeno de PreF, así como los ácidos nucleicos que los codifican (por ejemplo, como se describe a continuación). Diversos programas y algoritmos de alineamiento se describen en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151, 1989; Corpet y col., *Nucleic Acids Research* 16: 10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988. Altschul y col., *Nature Genet.* 6: 119, 1994, presenta una consideración detallada de procedimientos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología. La Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico del NCBI (BLAST) (Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403, 1990) está disponible a partir de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en internet, para uso en conexión con los programas de análisis de secuencias, *blastp*, *blastn*, *blastx*, *tblastn* y *tblastx*. Una descripción de cómo determinar la identidad de las secuencias usando este programa está disponible en la página web del NCBI en internet.
- En algunos casos, los antígenos de PreF tienen una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la cepa de origen natural a partir de la que se obtienen (por ejemplo, además de las modificaciones de estabilización mencionadas anteriormente). Tales diferencias pueden ser una adición, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos. Una variante por lo general se diferencia en no más de aproximadamente un 1 %, o un 2 %, o un 5 %, o un 10 %, o un 15 %, o un 20 % de los restos de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos del antígeno de PreF variante (incluyendo PreF-G) puede incluir 1, o 2, o hasta 5, o hasta aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 15, o hasta aproximadamente 50, o hasta aproximadamente 100 diferencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de polipéptidos del antígeno de PreF a modo de ejemplo de las SEQ ID NOs: 6, 8, y/o 10. Por lo tanto, una variante en el contexto de una proteína F o G del VSR, o antígeno de PreF (incluyendo antígeno de PreF-G), por lo general comparte una identidad de secuencias de al menos un 80 %, o un 85 %, más comúnmente, al menos aproximadamente un 90 % o superior, tal como un 95 %, o incluso un 98 % o un 99 % con una proteína de referencia, por ejemplo, las secuencias de referencias ilustradas en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y/o 10, o cualquiera de los antígenos de PreF a modo de ejemplo desvelados en el presente documento. Algunas variantes adicionales incluidas como una característica de la presente divulgación son antígenos de PreF (incluyendo antígenos de PreF-G) que incluyen todo o parte de una secuencia de nucleótidos o aminoácidos seleccionada entre las variantes de origen natural desveladas en el documento WO2008114149. Algunas variantes adicionales pueden surgir a través de deriva genética, o se pueden producir de forma artificial usando mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o mediante recombinación de dos o más variantes existentes previamente. Tales variantes adicionales también son adecuadas en el contexto de los antígenos de PreF (y de PreF-G) desvelados en el presente documento. Por ejemplo, la modificación puede ser una sustitución de uno o más aminoácidos (tal como los aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, cinco aminoácidos, hasta aproximadamente diez aminoácidos, o más) que no altera los epítomos de conformación o inmunogénicos del antígeno de PreF resultante.

Como alternativa o adicionalmente, la modificación puede incluir una deleción de uno o más aminoácidos y/o una

adición de uno o más aminoácidos. De hecho, si se desea, uno o más dominios de polipéptido pueden ser un polipéptido sintético que no se corresponde con ninguna cepa individual, pero incluye subsecuencias componentes de múltiples cepas, o incluso de una secuencia consenso deducida por alineamiento de múltiples cepas de polipéptidos del virus VSR. En determinadas realizaciones, uno o más de los dominios del polipéptido se modifica mediante la adición de una secuencia de aminoácidos que constituye una etiqueta, que facilita procesamiento o purificación posteriores. Una etiqueta de este tipo puede ser una etiqueta antigénica o de epítipo, una etiqueta enzimática o una etiqueta de polihistidina. Por lo general, la etiqueta está situada en uno o en el otro extremo de la proteína, tal como en el extremo C-terminal o N-terminal del antígeno o proteína de fusión.

#### ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN ANTÍGENOS DE PreF

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

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

El vector de expresión también puede incluir elementos de expresión adicionales, por ejemplo, para mejorar la eficacia de la traducción. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, un codón de inicio de ATG y secuencias adyacentes. En algunos casos, por ejemplo, un codón de inicio de la traducción y elementos de la secuencia asociados se insertan en el vector de expresión apropiado de forma simultánea con la secuencia de polinucleótidos de interés (por ejemplo, un codón de inicio nativo). En tales casos, no son necesarias señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que solamente una secuencia que codifica polipéptido, o una parte de la misma, se inserta, se proporcionan señales de control de traducción exógenas, incluyendo un codón de inicio de ATG para la traducción del ácido nucleico que codifica para el antígeno de PreF. El codón de inicio se coloca en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la secuencia de polinucleótidos de interés. Los elementos de transcripción exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. Si se desea, la eficacia de la expresión se puede aumentar adicionalmente mediante la inclusión de potenciadores apropiados con respecto al sistema celular en uso (Scharf y col., (1994) Results Probl Cell Differ 20: 125-62; Bitter y col., (1987) Methods in Enzymol 153: 516-544).

En algunos casos, el ácido nucleico (tal como un vector) que codifica el antígeno de PreF incluye uno o más elementos de la secuencia adicionales seleccionados para aumentar y/o optimizar la expresión del ácido nucleico que codifica PreF cuando se introduce en una célula hospedadora. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican el antígeno de PreF incluyen una secuencia de intrón, tal como una secuencia de intrón de virus 5 del Herpes Human (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 13). De forma repetida se ha demostrado que algunos intrones aumentan la expresión de ácidos nucleicos homólogos y heterólogos cuando se colocan de forma apropiada en una construcción recombinante. Otra clase de secuencias de potenciación de la expresión incluye un elemento epigenético tal como una Región de Unión a Matriz (o MAR), o un elemento epigenético similar, por ejemplo, elementos STAR (por ejemplo, tales como los elementos STAR desvelados en Otte y col., Biotechnol. Prog. 23: 801-807, 2007). Sin quedar ligado por la teoría, se cree que los MAR median en el anclaje de una secuencia de

ADN diana a la matriz nuclear, generando dominios de bucle de cromatina que se extienden hacia fuera de los núcleos de la heterocromatina. Aunque las MAR no contiene ninguna secuencia consenso o reconocible evidente, parece que su característica más coherente es un contenido de A/T elevado global, y bases de C que predominan en una hebra. Parece que estas regiones forman estructuras secundarias plegadas que pueden ser propensas a separación de hebras, y pueden incluir un elemento de desplegamiento de núcleo (CUE) que puede servir como el punto de nucleación para separación de hebras. Varios motivos de secuencia ricos en AT sencillos se han asociado con secuencias de MAR: por ejemplo, la caja A, la caja T, motivos de desplegamiento de ADN, sitios de unión a SATB1 (caja H, A/T/C25) y sitios de Topoisomerasa II consenso para vertebrados o *Drosophila*. Algunas secuencias de MAR a modo de ejemplo se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20070178469 publicada, y en la solicitud de patente internacional n.º WO02/074969. Algunas secuencias de MAR adicionales que se pueden usar para aumentar la expresión de un ácido nucleico que codifica un antígeno de PreF incluyen lisozima MAR de pollo, MARp1-42, MARp1-6, MARp1-68, y MARpx-29, descritas en Girod y col., *Nature Methods*, 4: 747-753, 2007 (desveladas en GenBank con los N.ºs de Referencia EA423306, D1107030, D1106196, D1107561, y D1106512, respectivamente). Un experto en la materia observará que la expresión se puede modular adicionalmente mediante la selección de una MAR que produce un nivel intermedio de potenciación, como se informa para MAR 1-9. Si se desea, algunas secuencias de MAR alternativas para aumento de la expresión de un antígeno de PreF se pueden identificar mediante búsqueda en bases de datos de secuencias, por ejemplo, usando software tal como MAR-Finder (disponible en la web en [futuresoft.org/MarFinder](http://futuresoft.org/MarFinder)), SMARTest (disponible en la web en [genomatix.de](http://genomatix.de)), o SMARScan I (Levitsky y col., *Bioinformatics* 15: 582-592, 1999). En determinadas realizaciones, la MAR se introduce (por ejemplo, se transfectar) en la célula hospedadora en el mismo ácido nucleico (por ejemplo, vector) que la secuencia que codifica antígeno de PreF. En una realización alternativa, la MAR se introduce en un ácido nucleico separado (por ejemplo, en trans) y se puede cointegrar opcionalmente con la secuencia de polinucleótidos que codifica antígeno de PreF.

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

Algunos ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican polipéptidos de antígeno de PreF se representan por las SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12 y 13. Algunas variantes adicionales se pueden producir mediante ensamblaje de secuencias de polipéptidos de proteína F y G análogas seleccionadas entre cualquiera de las cepas descubiertas (o posteriormente) conocidas del VSR, por ejemplo, como se desvela en el documento WO2008114149. Algunas variantes de secuencia adicionales que comparten identidad de secuencia con las variantes a modo de ejemplo las pueden producir los expertos en la materia. Por lo general, las variantes de ácido nucleico codificarán polipéptidos que se diferencian en no más de un 1 %, o un 2 %, o un 5 %, o un 10 %, o un 15 %, o un 20 % de los restos de aminoácidos. Es decir, los polipéptidos codificados comparten al menos una identidad de secuencias de un 80 %, o un 85 %, más comúnmente, al menos aproximadamente un 90 % o superior, tal como un 95 %, o incluso un 98 % o un 99 %. Los expertos en la materia entenderán inmediatamente que las secuencias de polinucleótido se codifican los polipéptidos de PreF, pueden compartir por sí mismas menos identidad de secuencias debido a la redundancia del código genético. En algunos casos, los antígenos de PreF tienen una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la cepa de origen natural a partir de la que se obtienen (por ejemplo, además de las modificaciones de estabilización mencionadas anteriormente). Tales diferencias pueden ser una adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Una variante por lo general se diferencia en no más de aproximadamente un 1 %, o un 2 %, o un 5 %, o un 10 %, o un 15 %, o un 20 % de los restos de nucleótidos. Por ejemplo, un ácido nucleico del antígeno de PreF variante (incluyendo PreF-G) puede incluir 1, o 2, o hasta 5, o hasta aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 15, o hasta aproximadamente 50, o hasta aproximadamente 100 diferencias de nucleótidos en comparación con los ácidos nucleicos del antígeno de PreF a modo de ejemplo de las SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12 y/o 13. Por lo tanto, una variante en el contexto de una proteína F o G del VSR, o ácido nucleico de antígeno de PreF (incluyendo antígeno de PreF-G), por lo general comparte una identidad de secuencias de al menos un 80 %, o un 85 %, más comúnmente, al menos aproximadamente un 90 % o superior, tal como un 95 %, o incluso un 98 % o un 99 % con una secuencia de referencia, por ejemplo, las secuencias de referencia ilustradas en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 12 o 13, o cualquiera de los otros ácidos nucleicos de antígeno de PreF a modo de ejemplo desvelados en el presente documento. Las variantes adicionales incluidas como una característica de la presente divulgación son antígenos de PreF (incluyendo antígenos de PreF-G) que incluyen toda o parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir de las variantes de origen natural desveladas en el documento WO2008114149. Las variantes adicionales pueden surgir a través de deriva genética, o se pueden producir de forma artificial usando mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o mediante la combinación de dos o más variantes existentes previamente. Tales variantes adicionales también son adecuadas en el contexto de los antígenos de PreF (y PreF-G) desvelados en el presente documento.

Además de los ácidos nucleicos variantes descritos anteriormente, algunos ácidos nucleicos que se hibridan con uno o más de los ácidos nucleicos a modo de ejemplo representados por las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 13 también

se pueden usar para codificar antígenos de PreF. Un experto en la materia observará que además del % de la medida de identidad de secuencias discutida anteriormente, otro indicio de similitud de secuencias entre los ácidos nucleicos es la capacidad de hibridarse. Cuanto más similares son las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más rigurosa son las condiciones en las que hibridarán. La rigurosidad de las condiciones de hibridación depende de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Por lo tanto, las condiciones de hibridación que dan como resultado grados de rigurosidad en particular variarán dependiendo de la naturaleza del procedimiento de hibridación de elección y la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos de hibridación. Por lo general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na<sup>+</sup> y/o Mg<sup>++</sup>) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Por lo general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 °C a 20 °C inferiores a las del punto de fusión térmica (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo la fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia diana se hibridan a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos y el cálculo de las rigurosidades se puede encontrar, por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 4<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

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

#### PROCEDIMIENTOS PARA PRODUCIR POLIPÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DEL VSR

Los antígenos de PreF (incluyendo antígenos de PreF-G, y también cuando sea aplicable, antígenos de G) desvelados en el presente documento se producen usando procedimientos bien establecidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Algunos procedimientos suficientes para guiar a un experto en la materia se pueden encontrar en las siguientes referencias: Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 4<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999. En lo sucesivo en el presente documento se proporcionan algunos detalles adicionales y específicos.

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

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

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

Las células hospedadoras se pueden cultivar en medio nutriente convencional modificado si fuera apropiado para activación de promotores, selección de transformantes, o amplificación de las secuencias de polinucleótidos insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, por lo general son las usadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia y las referencias mencionadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias citadas en ese documento. Los productos de expresión que corresponden a los ácidos nucleicos de la divulgación también se pueden producir en células animales tales como plantas, levadura, hongo, bacterias y similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, algunos detalles relacionados con el cultivo celular se pueden encontrar en Payne y col., (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamburg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell. Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se puede seleccionar dependiendo del uso pretendido para el producto expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo para la producción de anticuerpos, de forma favorable se usan vectores que dirigen un nivel de expresión elevado de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia de codificación de interés, por ejemplo, un polinucleótido de la invención como se ha descrito anteriormente, se puede ligar en el vector en marco con secuencias para la traducción amino-terminal comenzando en Metionina y los 7 restos posteriores de beta-galactosidasa que producen una proteína de fusión de beta galactosidasa catalíticamente activa; vectores de pIN (Van Heeke y Schuster (1989) J Biol Chem 264: 5503-5509); vectores de pET (Novagen, Madison WI), en los que la metionina amino-terminal está ligada en marco con una etiqueta de histidina; y similares.

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

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

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

- Después de la transducción de una línea de células hospedadoras adecuada y crecimiento de las células hospedadoras a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce mediante medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de temperatura o inducción térmica) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Opcionalmente, el medio incluye componentes y/o aditivos que disminuyen la declaración de proteínas expresadas por proteinasas. Por ejemplo, el medio usado para cultivar las células para producir el antígeno PreF pueden incluir un inhibidor de proteasa, tal como un agente de quelación o inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, AZ11557272, AS111793, etc.), para reducir o eliminar la escisión indeseada mediante proteinasas celulares, o extracelulares (por ejemplo, matriz).
- El producto de polipéptido secretado se recupera a continuación del medio de cultivo. Como alternativa, las células se pueden cosechar mediante centrifugación, interrumpir mediante medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante se puede retener para purificación adicional. Las células eucariotas o microbianas usadas en expresión de proteínas se pueden interrumpir mediante cualquier procedimiento conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica, o uso de agentes de lisado celular, u otros procedimientos, que son bien conocidos por los expertos en la materia.
- Los antígenos de PreF expresados se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante cualquiera de un número de procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, filtración, ultrafiltración, centrifugación, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas de etiquetados indicados en el presente documento), cromatografía de hidroxilapatita, y cromatografía de lectina. Se pueden usar etapas de replegamiento de proteínas, si se desea, para completar la configuración de la proteína madura. Por último, en las etapas de purificación final se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Además de las referencias indicadas anteriormente, en la técnica se conoce bien una diversidad de procedimientos de purificación, incluyendo, por ejemplo, los que se exponen en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bollag y col., (1996) *Protein Methods*, 2ª Edición Wiley-Liss, NY; Walquer (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles High Resolution Methods and Applications*, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walquer (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.
- En ciertos ejemplos, los ácidos nucleicos se introducen en células a través de vectores adecuados para introducción y expresión en células procariontas, por ejemplo, células de *E. coli*. Por ejemplo, un ácido nucleico que incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica un antígeno de PreF se puede introducir en cualquiera de una diversidad de vectores disponibles en el mercado o patentados, tales como la serie pET de vectores de expresión (por ejemplo, pET9b y pET2d). La expresión de la secuencia de codificación se puede inducir con IPTG, dando como resultado niveles elevados de expresión de proteína. La secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno de PreF se transcribe bajo el promotor T7 de fago. También son adecuados algunos vectores alternativos, tales como pURV22 que incluyen un promotor lambda pL inducible por calor.
- El vector de expresión se introduce (por ejemplo, mediante electroporación) en un hospedador bacteriano adecuado. Hay disponibilidad de numerosas cepas adecuadas de *E. coli* y las puede seleccionar un experto en la materia (por ejemplo, se ha demostrado que las cepas Rosetta y BL21 (DE3) son favorables para expresión de vectores recombinantes que contienen secuencias de polinucleótidos que codifican antígenos de PreF.
- Más habitualmente, los polinucleótidos que codifican los antígenos de PreF se incorporan en vectores de expresión que son adecuados para la introducción y expresión en células eucariotas (por ejemplo, células de insecto o mamífero). De forma favorable, tales ácidos nucleicos están optimizados por codón para su expresión en el lector/célula hospedadora seleccionado (por ejemplo, las secuencias ilustradas en las SEQ ID NOs: 5, 7, 9 y 12 están optimizadas por codón para su expresión en células CHO). En una realización a modo de ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno de PreF se introduce en un vector, tal como el vector pEE14 desarrollado por la firma Lonza Biologicals. El polipéptido se expresa en un promotor constitutivo, tal como el promotor de CMV (CitoMegaloVirus) temprano inmediato. La selección de las células transfectadas de forma estable que expresan el polipéptido se realiza basándose en la capacidad de las células transfectadas para crecer en ausencia de una fuente de glutamina. Las células que tienen integrado el vector pEE14 de forma satisfactoria son capaces de crecer en ausencia de glutamina exógena, porque el vector pEE14 expresa la enzima GS (Glutamina Sintetasa). Las células seleccionadas se pueden expandir de forma clonal y caracterizar para expresión del polipéptido de PreF deseado.
- En otro ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno de PreF se introduce en células de insecto usando un Sistema de Vector de Expresión de Baculovirus (BEVS). El baculovirus recombinante capaz de infectar células de insectos se puede generar usando vectores, kits y/o sistemas disponibles en el mercado, tal como el sistema BD BaculoGold de BD BioScience. En resumen, la secuencia de polinucleótidos que codifica el antígeno se inserta en el vector de transferencia pAcSG2. a continuación, las células hospedadoras SF9 (*Spodoptera frugiperda*) se cotransfectan mediante plásmido quimérico para pAcSG2 y BD BaculoGold, que contiene el ADN genómico linealizado del baculovirus del virus de *polydrosis nuclear de Autographa californica* (AcNPV). Después de la

transfección, la recombinación homóloga se produce entre el plásmido de pACSG2 y el genoma del Baculovirus para generar el virus recombinante. En un ejemplo, el antígeno de PreF se expresa bajo el control regulador del promotor de polihedrina (pH). Se pueden producir vectores de transferencia similares usando otros promotores, tales como los promotores básicos (Ba) y p10. Del mismo modo, se pueden usar células de insecto alternativas, tal como SF21 que se relaciona en gran medida con Sf9, y la línea celular High Five obtenida a partir de un gusano gris de la col, *Trichoplusia ni*.

Después de transfección e inducción de expresión (de acuerdo con el promotor y/o potenciadores u otros elementos de regulación seleccionados), los polipéptidos expresados se recuperan (por ejemplo, purificados o enriquecidos) y se vuelven a naturalizar para asegurar el plegamiento en una conformación de prefusión antigénicamente activa.

## 10 COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y PROCEDIMIENTOS

También se proporcionan composiciones inmunogénicas que incluyen cualquiera de los antígenos de PreF desvelados anteriormente (tal como los proporcionados a modo de ejemplo con la SEQ ID NOs: 6, 8 y 10) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, por lo general, realizaciones en las que el antígeno de PreF no incluye un componente de la proteína G (tal como SEQ ID NO: 6), la composición inmunogénica puede incluir una proteína G aislada, recombinante y/o purificada. En la técnica se han descrito numerosas proteínas G adecuadas, e incluyen proteínas G recombinantes de longitud completa y proteínas quiméricas formadas por una parte de la proteína G (tal como los aminoácidos 128-229 o 130-230) y un compañero de fusión (tal como tiorredoxina), o una secuencia señal y/o directora, que facilitan la expresión y/o purificación. Algunas proteínas G a modo de ejemplo para uso en mezcla con un antígeno de PreF se pueden encontrar en el documento WO2008114149, Patente de Estados Unidos n.º 5.149.650, Patente de Estados Unidos n.º 6.113.911, Solicitud Publicada de Estados Unidos n.º 20080300382, y Patente de Estados Unidos n.º 7.368.537. Como se indica con respecto a las proteínas PreF-G quiméricas, un fragmento más pequeño de la proteína G, tal como la parte entre los aminoácidos 149-229, o la parte entre aproximadamente 128 y aproximadamente 229 se puede usar de forma favorable en el contexto de mezclas que implican un PreF (sin G) y G. Como se ha analizado anteriormente, la consideración importante es la presencia de epítomos inmunodominantes, por ejemplo, incluidos dentro de la región de los aminoácidos 183-197. Como alternativa, en tales composiciones se puede usar una proteína G de longitud completa.

Algunos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien y los pueden seleccionar los expertos en la materia. Por ejemplo, el vehículo o excipiente puede incluir de forma favorable un tampón. Opcionalmente, el vehículo o excipiente también contiene al menos un componente que estabiliza la solubilidad y/o estabilidad. Algunos ejemplos de agentes solubilizantes/estabilizantes incluyen detergentes, por ejemplo, lauril sarcosina y/o tween. Algunos agentes solubilizantes/estabilizantes adecuados incluyen arginina, y polioles que forman vidrio (tales como sacarosa, trehalosa y similares). En la técnica se conocen numerosos vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences de Remington, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5ª Edición (975).

Por consiguiente, algunos excipientes y vehículos adecuados los pueden seleccionar los expertos en la materia para producir una formulación adecuada para administrar a un sujeto mediante una vía de administración seleccionada.

Algunos excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: glicerol, Polietilenglicol (PEG), Sorbitol, Trehalosa, San sódica de N-lauroilsarcosina, L-prolina, sulfobetaina no detergente, clorhidrato de Guanidina, Urea, óxido de Trimetilamina, KCl, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y otras sales relacionadas con cationes divalentes, Ditiotreitrol, Ditiioeritrol, y β-mercaptoetanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (incluyendo: Tween 80, Tween 20, Triton X-00, NP-40, Empigen BB, Octilglucósido Lauroil maltósido, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, desoxicolato sódico, dodecil sulfato sódico, bromuro de Cetiltrimetilamonio).

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también incluyen un adyuvante. En el contexto de una composición inmunogénica adecuada para administración a un sujeto con el fin de provocar una respuesta inmune protectora frente al VSR, el adyuvante se selecciona para provocar una respuesta inmune desviada hacia Th1.

Por lo general el adyuvante se selecciona para que aumente una respuesta inmune desviada hacia Th1 en el sujeto, o población de sujetos, a los que se administra la composición. Por ejemplo, cuando la composición inmunogénica se va a administrar a un sujeto de un grupo de edades en particular susceptible a (o con un aumento del riesgo de) infección por VSR, el adyuvante se selecciona para que sea seguro y eficaz en el sujeto o población de sujetos. Por lo tanto, cuando se formula una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF del VSR para administración en un sujeto de mayor edad (tal como un sujeto con una edad superior a 65 años de edad), el adyuvante se selecciona para que sea seguro y eficaz en sujetos de edades avanzadas. De forma análoga, cuando la composición inmunogénica que contiene el antígeno de PreF del VSR se pretende para administración en sujetos neonatales o infantiles (tales como sujetos entre el nacimiento y la edad de dos años), el adyuvante selecciona para que sea seguro y eficaz en neonatos y niños.

Además, el adyuvante por lo general se selecciona para que aumente una respuesta inmune de Th1 cuando se administra a través de la vía de administración, mediante la que se administra la composición inmunogénica. Por

ejemplo, cuando se formula una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF para administración nasal, son favorables proteosoma y protolina son adyuvantes de desviación de Th1 favorables. Por el contrario, cuando la composición inmunogénica se formula para administración intramuscular, se seleccionan de forma favorable algunos adyuvantes que incluyen uno o más de 3D-MPL, escualeno (por ejemplo, QS21), liposomas, y/o emulsiones de aceite y agua.

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

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

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

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

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de causar una respuesta de señalización a través de TLR-4 (Sabroe y col., JI 2003 p1630-5) son, por ejemplo, lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; Proteína A de tensioactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2, y dipéptido muramilo (MDP). En una realización, el agonista de TLR es HSP 60, 70 o 90. Otros ligandos de TLR-4 adecuados son los que se describen en el documento WO 2003/011223 y en el documento WO 2003/099195, tales como el compuesto I, compuesto II y compuesto III desvelados en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195 y en particular los compuestos desvelados en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, y ER804764. Por ejemplo, un ligando de TLR-4 adecuado es ER804057.

Algunos agonistas de TLR adicionales también son útiles como adyuvantes. La expresión "agonista de TLR" se refiere a un agente es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de generación de ligando endógeno o exógeno. Tales agonistas de TLR naturales o sintéticos se pueden usar como adyuvantes alternativos o adicionales. Una breve revisión del papel de los TLR como receptores de adyuvante se proporcionan en Kaisho y Akira, Biochimica et Biophysica Acta 1589: 1-13, 2002. Estos adyuvantes potenciales incluyen, pero no se limitan a, agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. Por consiguiente, en una realización, el adyuvante y la composición

inmunogénica comprenden adicionalmente un adyuvante que se selecciona entre el grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, un agonista de TLR-9, o una combinación de los mismos.

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

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

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

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

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

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

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

40 En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9. En una realización, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es HSP90. Como alternativa, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es ADN bacteriano o viral, ADN que contiene nucleótidos de CpG sin metilar, en contextos de secuencias en particular conocidos como motivos de CpG. Algunos oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta de Th1 predominantemente. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/02555, el documento WO 99/33488 y Patentes de Estados Unidos n.ºs 6.008.200 y 5.856.462. De forma adecuada, los nucleótidos de CpG son oligonucleótidos de CpG. Algunos oligonucleótidos adecuados para uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, opcionalmente que contienen dos o más motivos de CpG dinucleótidos separados por al menos tres, adecuadamente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo de CpG es un nucleótido de Citosina seguido de un nucleótido de Guanina. Los oligonucleótidos de CpG de la presente invención son por lo general desoxinucleótidos. En una realización específica, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o adecuadamente un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleótido están dentro del alcance de la invención. Dentro del alcance de la invención también están incluidos oligonucleótidos con uniones internucleótido mixtas. Algunos procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en las Patentes de Estados Unidos n.ºs 5.666.153, 5.278.302 y en el documento WO 95/26204.

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

Algunas saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and

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

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

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

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

Otra clase de adyuvantes de desviación de Th1 adecuados para uso en formulaciones con antígenos de PreF incluye composiciones inmunoestimulantes a base de OMP. Las composiciones inmunoestimulantes a base de OMP son particularmente adecuadas como adyuvantes mucosales, por ejemplo, para administración intranasal. Las composiciones inmunoestimulantes a base de OMP son un género de preparaciones de proteínas de membrana externa (OMP, que incluyen algunas porinas) de bacterias Gram-negativas, tales como, pero no limitadas a, especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo, Lowell y col., *J. Exp. Med.* 167: 658, 1988; Lowell y col., *Science* 240: 800, 1988; Lynch y col., *Biophys. J.* 45: 104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines" 2ª ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basilea, Hong Kong, página 193, 1997; Patente de Estados Unidos n.º 5.726.292; Patente de Estados Unidos n.º 4.707.543), que son útiles como un vehículo o en composiciones para inmunógeno, tales como antígenos bacterianos o virales. Algunas composiciones inmunoestimuladoras a base de OMP se pueden denominar "Proteosomas", que son hidrófobos y seguros para uso humano. Los proteosomas tienen la capacidad para autoensamblarse en vesículas o grupos de OMP similares a las vesículas de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, y para incorporar, coordinar, asociar (por ejemplo, preforma electrostática o hidrófoba), o de otro modo cooperar de forma no covalente con antígenos de proteína (Ags), en particular antígenos que tienen un resto hidrófobo. Cualquier procedimiento de preparación que dé como resultado el componente de la proteína de la membrana externa en forma vesicular o similar a vesícula, incluyendo estructuras membranosas las multi-moleculares o composiciones de OMP similares a glóbulos fundidos de una o más OMP, está incluido dentro de la definición de Proteosoma. Los proteosomas se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.726.292 o Patente de Estados Unidos n.º 5.985.284). Los proteosomas también pueden contener un lipopolisacárido o lipooligosacárido endógeno (LPS o LOS, respectivamente) que se originan a partir de las bacterias usadas para producir las porinas de OMP (por ejemplo, especies de *Neisseria*), que por lo general serán menos de un 2 % de la preparación de la OMP total.

Los proteosomas están formados principalmente por proteínas de la membrana externa a extraídas de forma química (las OMP) de *Neisseria meningitidis* (principalmente las porinas A y B así como OMP de clase 4), mantenidas

en solución con detergente (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Los proteosomas se pueden formular con una diversidad de antígenos tales como proteínas purificadas o recombinantes derivadas de fuentes virales, incluyendo los polipéptidos de PreF desvelados en el presente documento, por ejemplo, mediante procedimientos tradicionales de diafiltración o de diálisis. La retirada gradual del detergente permite la formación de complejos hidrófobos de partículas de aproximadamente 100-200 nm de diámetro (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

"Proteosoma: LPS o Protolina", como se usa en el presente documento, se refiere a preparaciones de proteosomas mezcladas, por ejemplo, mediante la adición exógena, con al menos un tipo de lipo-polisacárido para proporcionar una composición de OMP-LPS (que puede funcionar como una composición inmunoestimulante). Por lo tanto, la composición de OMP-LPS puede estar formada por dos de los componentes básicos de la Protolina, que incluyen (1) una preparación de proteína de membrana externa de Proteosomas (por ejemplo, Projuvant) preparada a partir de bacterias Gram-negativas, tales como *Neisseria meningitidis*, y (2) una preparación de uno o más liposacáridos. Un lipo-oligosacárido puede ser endógeno (por ejemplo, contenido de forma natural con la preparación de Proteosoma de OMP), se puede mezclar o combinar con una preparación de OMP a partir de un lipo-oligosacárido preparado de forma exógena (por ejemplo, preparado a partir de un cultivo o microorganismo diferente de a la preparación de OMP), o puede ser una combinación de los mismos. Tales LPS añadidos de forma exógena pueden ser de la misma bacteria Gram-negativa a partir de la que se fabricó la preparación de OMP o de una bacteria Gram-negativa diferente. Se debería entender que la protolina incluye opcionalmente lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, moléculas pequeñas, o similares, y combinaciones de los mismos. La Protolina se puede preparar, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0044425.

Las combinaciones de diferentes adyuvantes, tales como las mencionadas anteriormente en el presente documento, también se pueden usar en composiciones con antígenos de PreF. Por ejemplo, como ya se ha indicado, QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La proporción de QS21 : 3D-MPL por lo general será del orden de 1:10 a 10:1; tal como de 1:5 a 5:1, y a menudo sustancialmente 1:1. Por lo general, la proporción está en el intervalo de 2,5:1 a 1:1 de 3D-MPL: QS21. Otra formulación de adyuvante de combinación incluye 3D-MPL y una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. Cuando se formula en combinación con esta combinación puede aumentar una respuesta inmune de Th1 específica de antígeno.

En algunos casos, la formulación de adyuvante incluye una emulsión de aceite en agua, o una sal mineral, tal como una sal de calcio o aluminio, por ejemplo fosfato cálcico, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

Un ejemplo de una emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, un tocol tal como tocoferol, por ejemplo, alfa-tocoferol, y un tensioactivo, tal como polisorbato 80 o Tween 80, en un vehículo acuoso y no contiene ningún inmunoestimulante(s) adicional, en particular, no contiene un derivado del lípido A no tóxico, (tal como 3D-MPL), o una saponina, (tal como QS21). El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

En otra realización de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua y opcionalmente uno o más agentes inmunoestimulantes, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende 0,5-10 mg de aceite metabolizable (adecuadamente escualeno), 0,5-11 mg de tocol (adecuadamente un tocoferol, tal como alfa-tocoferol) y 0,4-4 mg de agente emulgente.

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

Por ejemplo, cuando una composición inmunogénica con un antígeno de polipéptido de PreF se formula para su administración a un lactante, la dosificación de adyuvante se determina para que sea eficaz y relativamente no reactogénica en un sujeto lactante. Por lo general, la dosificación de adyuvante en una formulación para lactante es inferior a la usada en formulaciones designadas para su administración a adultos (por ejemplo, adultos con edades de 65 o superiores). Por ejemplo, la cantidad de 3D-MPL por lo general está en el intervalo de 1 µg-200 µg, tal como 10-100 µg, o 10 µg-50 µg por dosis. Una dosis para lactante está por lo general en el extremo inferior de este intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg, tal como de aproximadamente 2 µg, o aproximadamente 5 µg, o aproximadamente 10 µg, a aproximadamente 25 µg, o a aproximadamente 50 µg, por lo general, cuando se usa QS21 en la formulación, los intervalos son comparables (y están de acuerdo con las proporciones indicadas anteriormente). Para poblaciones de adultos y ancianos, las formulaciones incluyen por lo general más de un componente adyuvante que por lo general se encuentra en una formulación infantil. En

formulaciones en particular que usan una emulsión de aceite en agua, una emulsión de este tipo puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, tal como colesterol, escualeno, alfa tocoferol, y/o un detergente, tal como Tween 80 o Span 85. En formulaciones a modo de ejemplo, tales componentes pueden estar presentes en las siguientes cantidades: de aproximadamente 1-50 mg de colesterol, de un 2 a un 10 % de escualeno, de un 2 a un 10 % de alfa tocoferol y de un 0,3 a un 3 % de Tween 80. Por lo general, la proporción de escualeno: alfa tocoferol es igual o inferior a 1 ya que ésta proporciona una emulsión más estable. En algunos casos, la formulación también puede contener un estabilizante. Cuando el alumbre está presente, por ejemplo, en combinación con 3D-MPL, la cantidad está por lo general entre aproximadamente 100 µg y 1 mg, tal como de aproximadamente 100 µg, o aproximadamente 200 µg aproximadamente 750 µg, tal como aproximadamente 500 µg por dosis.

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

Por lo general, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en el sujeto habitual. Inmunoprotector en este contexto no significa necesariamente que proteja completamente frente a la infección; significa protección frente a síntomas o enfermedad, en especial enfermedad grave asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se use. Por lo general, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1000 µg de proteína, tal como de aproximadamente 11 µg a aproximadamente 100 µg, por ejemplo, de aproximadamente 11 µg a aproximadamente 50 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg, o aproximadamente 50 µg. La cantidad usada en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población de sujetos (por ejemplo, infantil o adulta). Una cantidad continua para una composición en particular se puede discernir con estudios convencionales que implican observación de titulaciones de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas.

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

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénica son vacunas que reducen o previenen la infección con VSR. En algunas realizaciones, las composiciones inmunogénica son vacunas que reducen o previenen una respuesta patológica después de infección con VSR. Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno de PreF se formulan con al menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto del VSR. Por ejemplo, el organismo patógeno puede ser un agente patógeno del tracto respiratorio (tal como un virus o bacteria que causa una infección respiratoria). En ciertos casos, la composición inmunogénica contiene un antígeno derivado del virus patógeno distinto del VSR, tal como un virus que causa una infección del tracto respiratorio, tal como gripe o parainfluenza. En otras realizaciones, los antígenos adicionales se seleccionan para facilitar la administración o reducir el número de inoculaciones necesarias para proteger a un sujeto frente a una pluralidad de organismos infecciosos. Por ejemplo, el antígeno se puede derivar de uno cualquiera o más de gripe, hepatitis B, difteria, tétanos, pertussis, *Hemophilus influenza*, poliovirus, *Streptococcus* o *Pneumococcus*, entre otros.

Por consiguiente, el uso de antígenos de PreF o ácidos nucleicos que los codifican en la preparación de un medicamento para tratar (ya sea de forma terapéutica después de o de forma profiláctica antes de) la exposición a una infección con el VSR también es una característica de la presente divulgación. De forma análoga, algunos procedimientos para provocar una respuesta inmune frente al VSR en un sujeto son una característica de la presente divulgación. Tales procedimientos incluyen la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende un antígeno de PreF a un sujeto, tal como un sujeto humano. Normalmente, la composición incluye un adyuvante que provoca una respuesta inmune desviada hacia Th1. La composición se formula para provocar una respuesta inmune específica para el VSR sin aumentar la enfermedad viral después del contacto con el VSR. Es decir, la composición se formula para ir a como resultado una respuesta inmune desviada

hacia Th1 que reduce o previene la infección con un VSR y/o reduce o previene una respuesta patológica después de infección con un VSR. Aunque la composición se puede administrar mediante una diversidad de vías diferentes, lo más habitualmente, las composiciones inmunogénica se administran mediante una vía de administración intramuscular o intranasal.

5 Por lo general, una composición inmunogénica contiene una cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccionaria de la misma) del antígeno y se puede preparar mediante técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, incluyendo las usadas para administración a sujetos humanos, por lo general se describe en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccina Design-the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, Patente de Estados Unidos n.º 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se desvela, por ejemplo, en Likhite, Patente de Estados Unidos n.º 4.372.945 y en Armor y col., Patente de Estados Unidos n.º 4.474.757.

15 Por lo general, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en el sujeto habitual. En este contexto, inmunoprotector no significa necesariamente protección completamente frente a la infección; significa protección frente a síntomas o enfermedad, especialmente enfermedad grave asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se esté usando. Por lo general, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1000 µg de proteína, tal como de aproximadamente 11 µg a aproximadamente 100 µg, por ejemplo, de aproximadamente 11 µg a aproximadamente 50 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg, o aproximadamente 50 µg. La cantidad usado en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población de sujetos (por ejemplo, niños o ancianos). Una cantidad óptima para una composición en particular se puede discernir con estudios convencionales que implican la observación de titulaciones de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4-12 semanas. Por ejemplo, cuando se administra una composición inmunogénica que contiene un antígeno de PreF a un sujeto infantil, las inoculaciones iniciales y posteriores se pueden administrar para que coincidan con otras vacunas administradas durante este periodo.

30 Párrafos que desvelan adicionalmente aspectos de la invención:

1. Un antígeno del virus sincitial respiratorio (VSR) recombinante que comprende un polipéptido de la proteína F soluble que comprende al menos una modificación que estabiliza la conformación de prefusión de la proteína F.

2. Un antígeno del virus sincitial respiratorio (VSR) recombinante que comprende un polipéptido de la proteína F soluble, comprendiendo dicho polipéptido de la proteína F al menos una modificación seleccionada de:

35 (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo;  
 (ii) una deleción de al menos un sitio de escisión de furina;  
 (iii) una deleción de al menos un sitio de escisión distinto de furina;  
 (iv) una deleción de uno o más aminoácidos del dominio pep27; y  
 (v) al menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrófilo en un dominio hidrófobo del dominio  
 40 extracelular de proteína F.

3. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 1 o 2, en el que el polipéptido de la proteína F soluble comprende un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> de un polipéptido de la proteína F de VSR.

45 4. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-3, en el que la al menos una modificación comprende la adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo.

5. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 4, en el que el dominio de trimerización heterólogo se sitúa en dirección C terminal del dominio F<sub>1</sub>.

6. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-5, que comprende un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> sin ningún sitio de escisión de furina intermedio.

50 7. Un análogo de proteína de Fusión (F) que comprende un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> de un polipéptido de la proteína F de VSR, en el que no hay ningún sitio de escisión de furina entre el dominio F<sub>2</sub> y el dominio F<sub>1</sub>, y en el que el polipéptido comprende además un dominio de trimerización heterólogo situado en dirección C terminal del dominio F<sub>1</sub>.

55 8. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-7, en el que el antígeno de VSR se ensambla en un trímero.

9. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 3-8, en el que el dominio F<sub>2</sub> comprende al menos una parte de un polipéptido de la proteína F de VSR correspondiente a los aminoácidos 26-105 del polipéptido precursor de proteína F de referencia F (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
- 5 10. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 3-9 y en el que el dominio F<sub>1</sub> comprende al menos una parte de un polipéptido de la proteína F de VSR correspondiente a los aminoácidos 137-516 del polipéptido precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
- 10 11. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 3-10, en el que el dominio F<sub>2</sub> comprende un polipéptido de la proteína F de VSR correspondiente a los aminoácidos 26-105 y/o en el que el dominio F<sub>1</sub> comprende un polipéptido de la proteína F de VSR correspondiente a los aminoácidos 137-516 del polipéptido precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
12. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 9-11, en el que el antígeno de VSR se selecciona del grupo de:
- 15 a) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6;  
 b) un polipéptido que hibrida en condiciones rigurosas sobre sustancialmente su longitud completa con la SEQ ID NO: 6, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos correspondiente a una cepa de VSR de origen natural;  
 c) un polipéptido con al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que no corresponde a una cepa de VSR de origen natural.
- 20 13. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-12, que comprende además un péptido señal.
14. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-13, en el que el dominio F<sub>2</sub> comprende los aminoácidos 1-105 del polipéptido de la proteína F de VSR.
15. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 3-14, en el que el dominio F<sub>2</sub> y el dominio F<sub>1</sub> se sitúan sin un dominio pep27 intermedio.
- 25 16. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 4-15, en el que el dominio de trimerización heterólogo comprende un dominio de bucles superenrollados.
17. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 16, en el que el dominio de multimerización comprende una cremallera de isoleucina.
- 30 18. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 17, en el que el dominio de cremallera de isoleucina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.
19. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-18, en el que el antígeno de VSR comprende al menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrófilo en un dominio hidrófobo del dominio extracelular de proteína F.
- 35 20. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 19, en el que el dominio hidrófobo es el dominio de bucles superenrollados de HRB del dominio extracelular de proteína F.
21. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 20, en el que el dominio de bucles superenrollados de HRB comprende la sustitución de un resto con carga en lugar de un resto neutro en la posición correspondiente al aminoácido 512 del precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
- 40 22. El antígeno de VSR del párrafo 21, en el que el dominio de bucles superenrollados de HRB comprende una sustitución de leucina por lisina en la posición correspondiente al aminoácido 512 del precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
23. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 19, en el que el dominio hidrófobo es el dominio de HRA del dominio extracelular de proteína F.
- 45 24. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 23, en el que el dominio de HRA comprende la adición de un resto con carga tras la posición correspondiente al aminoácido 105 del precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
25. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 24, en el que el dominio de HRA comprende la adición de una lisina tras la posición correspondiente al aminoácido 105 del precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.
- 50 26. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 19-25, en el que el antígeno de VSR comprende al menos una primera sustitución o adición de un aminoácido hidrófilo en el dominio de HRA y al

menos una segunda sustitución o adición de un aminoácido hidrófilo en el dominio de HRB del dominio extracelular de proteína F.

5 27. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-26, en el que el antígeno de VSR comprende al menos una adición, delección o sustitución de aminoácido que elimina un sitio de escisión de furina presente en un precursor de proteína F de origen natural (F<sub>0</sub>).

10 28. El antígeno de VSR recombinante de 27, en el que el antígeno de VSR comprende una adición, delección o sustitución de aminoácidos que elimina un sitio de escisión de furina en una posición correspondiente a los aminoácidos 105-109, una posición correspondiente a los aminoácidos 133-136 o en ambas posiciones correspondientes a los aminoácidos 105-109 y 133-136 del precursor de proteína F de referencia (F<sub>0</sub>) de la SEQ ID NO: 2.

29. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-28, que comprende además un polipéptido de la proteína G que comprende las posiciones de aminoácidos 149 a 229 de un polipéptido de la proteína G de VSR.

15 30. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 29, en el que el antígeno de VSR se selecciona del grupo de:  
 a) un polipéptido que comprende las SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10;  
 b) un polipéptido que hibrida en condiciones rigurosas sobre sustancialmente su longitud completa con al menos una de las SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos correspondiente a una cepa de VSR de origen natural;  
 20 c) un polipéptido con al menos 95 % de identidad de secuencia con al menos una de las SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que no corresponde a una cepa de VSR de origen natural.

31. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 29 o 30, en el que el polipéptido de la proteína G comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones de aminoácidos 149 a 229 de la secuencia de proteína G de referencia de la SEQ ID NO: 4.

25 32. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 31, en el que el polipéptido de la proteína G comprende los aminoácidos 149-229 de la SEQ ID NO: 4.

30 33. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 29 o 30, en el que el polipéptido de la proteína G comprende al menos una sustitución de aminoácido en relación con un polipéptido de VSR de origen natural, correlacionándose dicha sustitución de aminoácido con la reducción o prevención de enfermedad vírica potenciada por vacuna.

34. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 33, en el que la enfermedad vírica potenciada se reduce o previene cuando el antígeno de VSR se administra a un sujeto en ausencia de adyuvante.

35. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 33, en el que la enfermedad vírica potenciada por vacuna se reduce o previene cuando el antígeno de VSR se administra a un sujeto humano.

36. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 33, en el que el polipéptido de la proteína G comprende una sustitución de asparagina por alanina en la posición 191 (N191A) de la proteína G.

37. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-36, que comprende además un conector.

40 38. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 37, en el que el conector comprende la secuencia de aminoácidos GG.

39. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 38, en el que el conector comprende la secuencia de aminoácidos GGSGGSGGS.

40. El antígeno de VSR recombinante del párrafo 39, en el que el conector se selecciona del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en: GG y GGSGGSGGS.

45 41. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-40, en el que el polipéptido de la proteína F corresponde en secuencia a la cadena larga A de VSR.

42. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-41, en el que el polipéptido de la proteína F comprende además un marcador de polihistidina.

50 43. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-42, en el que el antígeno de VSR comprende un multímero de polipéptidos.

## ES 2 719 406 T3

44. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-43, en el que el antígeno de VSR comprende un trímero de polipéptidos.
45. Una composición inmunogénica que comprende el antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-44, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 46. La composición inmunogénica del párrafo 45, en la que el vehículo o excipiente comprende un tampón.
47. La composición inmunogénica del párrafo 45 o 46, que comprende además un adyuvante.
48. La composición inmunogénica del párrafo 47, en la que el adyuvante induce una respuesta inmunitaria desplazada hacia Th1.
- 10 49. La composición inmunogénica del párrafo 48, en la que el adyuvante comprende al menos uno de: 3D-MPL, QS21, una emulsión de aceite en agua y alumbre.
50. La composición inmunogénica del párrafo 49, en la que el adyuvante comprende una emulsión de aceite en agua.
51. La composición inmunogénica del párrafo 49 o 50, en la que la emulsión de aceite en agua comprende un tocol.
- 15 52. La composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 49-51, que comprende además 3D-MPL.
53. La composición inmunogénica del párrafo 49, en la que el adyuvante comprende 3D-MPL.
54. La composición inmunogénica del párrafo 53, que comprende además alumbre.
55. La composición inmunogénica del párrafo 53, que comprende además QS21.
- 20 56. La composición inmunogénica del párrafo 53, en la que el 3D-MPL y QS21 están en una formulación liposómica.
57. La composición inmunogénica del párrafo 47 o 48, en la que el adyuvante es adecuado para administración a un neonato.
58. La composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-57, en la que la composición inmunogénica reduce o previene la infección con Virus Sincitial Respiratorio (VSR).
- 25 59. La composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-58, en la que la composición inmunogénica reduce o previene una respuesta patológica después de infección con VSR.
60. La composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-59, en la que cuando la composición inmunogénica comprende el antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-28 la composición inmunogénica comprende además un polipéptido de la proteína G que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones de aminoácidos 149 a 229 de un polipéptido de la proteína G de VSR.
- 30 61. La composición inmunogénica del párrafo 60, en la que el polipéptido de la proteína G comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones de aminoácidos 128-229 de un polipéptido de la proteína G de VSR.
- 35 62. La composición inmunogénica del párrafo 60 o 61, en la que el polipéptido de la proteína G comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones de aminoácidos 149 a 229 de la secuencia de proteína G de referencia de la SEQ ID NO: 4.
63. La composición inmunogénica del párrafo 62, en la que el polipéptido de la proteína G comprende los aminoácidos 149-229 de la SEQ ID NO: 4.
- 40 64. La composición inmunogénica del párrafo 60 o 61, en la que el polipéptido de la proteína G comprende al menos una sustitución de aminoácido en relación con un polipéptido de VSR de origen natural, correlacionándose dicha sustitución de aminoácido con la reducción o prevención de enfermedad vírica potenciada por vacuna.
- 45 65. La composición inmunogénica del párrafo 60 o 64, en la que el polipéptido de la proteína G comprende un polipéptido de la proteína G de longitud completa o una proteína de fusión que comprende al menos una parte de un polipéptido de la proteína G.
66. La composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-65, que comprende además al menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto de VSR.

67. La composición inmunogénica del párrafo 66, en la que el al menos un antígeno adicional es de un virus distinto de VSR.
68. La composición inmunogénica del párrafo 67, en la que el virus se selecciona de virus de la hepatitis B (VHB), virus paragripal (PIV), poliovirus y virus de la gripe.
- 5 69. La composición inmunogénica del párrafo 66, en la que el al menos un antígeno adicional se selecciona de: difteria, tétanos, tosferina, *Haemophilus influenzae* y *Pneumococcus*.
70. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-44.
- 10 71. El ácido nucleico recombinante del párrafo 70, en el que la secuencia polinucleotídica que codifica el antígeno de VSR tiene codones optimizados para su expresión en una célula huésped seleccionada.
72. Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante del párrafo 70 o 71.
73. El vector del párrafo 72, en el que el vector comprende un vector de expresión procariota o eucariota.
74. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico del párrafo 70 o 71 o el vector del párrafo 72 o 73.
- 15 75. La célula hospedadora del párrafo 74, en la que la célula hospedadora se selecciona del grupo de: células bacterianas, células de insectos y células de mamíferos.
76. Una composición inmunogénica que comprende el ácido nucleico del párrafo 70 o 71, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
77. El uso del antígeno de VSR de uno cualquiera de los párrafos 1-44 o el ácido nucleico del párrafo 70 o 71 en la preparación de un medicamento para tratar una infección por VSR.
- 20 78. El uso del antígeno de VSR o ácido nucleico del párrafo 76, en el que el medicamento se administra con el fin de tratar de forma profiláctica una infección por VSR.
79. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra Virus Sincitial Respiratorio (VSR), comprendiendo el método: administrar a un sujeto una composición que comprende el antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-44 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-69.
- 25 80. El método del párrafo 79, en el que la administración de la composición que comprende el antígeno de VSR induce una respuesta inmunitaria específica para VSR sin potenciar la enfermedad vírica después del contacto con VSR.
81. El método del párrafo 79 u 80, en el que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria desplazada hacia Th1.
- 30 82. El método de uno cualquiera de los párrafos 79-81, en el que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria protectora que reduce o previene la infección con un VSR y/o reduce o previene una respuesta patológica tras infección con un VSR.
83. El método de uno cualquiera de los párrafos 79-82, en el que el sujeto es un sujeto humano.
- 35 84. El método de uno cualquiera de los párrafos 79-83, que comprende administrar la composición que comprende el antígeno de VSR comprende administrar mediante una vía intranasal.
85. El método de uno cualquiera de los párrafos 79-83, que comprende administrar la composición que comprende el antígeno de VSR comprende administrar mediante una vía intramuscular.
86. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-44 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-69 para su uso en medicina.
- 40 87. El antígeno de VSR recombinante de uno cualquiera de los párrafos 1-44 o la composición inmunogénica de uno cualquiera de los párrafos 45-69 para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas con VSR.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones en particular. No se debería interpretar que estos ejemplos limitan la invención a las características por realizaciones que se describen en particular.

45 **Ejemplos**

**Ejemplo 1: Antígenos de PreF a modo de ejemplo**

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

La FIG. 1A y B ilustran de forma esquemática características de F0 del VSR y antígenos recombinantes de PreF a modo de ejemplo. La FIG. 1A es una representación de la proteína F0 del VSR. F0 es una proteína previa que consiste en 574 aminoácidos. La proteína previa F0 se procesa de forma proteolítica y se glicosilada después de la traducción. Un péptido señal, que posteriormente se retira con una peptidasa señal, dirige la traducción de la proteína previa F0 al retículo endoplasmático (RE). El péptido emergente en el RE se N-glicosila a continuación en múltiples sitios (representados por triángulos). La escisión de la furina de F0 genera dominios peptídicos F2 y F1, que se pliegan y ensamblan en conjunto como un trímero de heterodímeros F2-F1 (es decir, 3 veces F2-F1). En su estado nativo, la proteína F está anclada a la membrana mediante una hélice transmembrana helix en la región C-terminal. La adición de características del polipéptido F0 incluye, 15 restos de cisteína, 4 epítomos de neutralización caracterizados, 2 regiones de bucles superenrollados, y un motivo de lipidación. La FIG. 1B ilustra características de antígenos de PreF a modo de ejemplo. Para construir el antígeno de PreF, el polipéptido F0 se modificó para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F, reteniendo de este modo los epítomos inmunogénicos predominantes de la proteína F como se presenta con el virus del VSR antes de la unión a y fusión con células hospedadoras. Las siguientes mutaciones de estabilización se introdujeron en el antígeno de PreF con respecto al polipéptido F0. En primer lugar, un dominio bucles superenrollados de estabilización se puso en el extremo C-terminal del dominio extracelular del polipéptido de F0, reemplazando el dominio de anclaje a membrana de F0. En segundo lugar, el péptido pep27 (situado entre los dominios F2 y F1 en la proteína nativa) se retiró. En tercer lugar, ambos motivos de furina se eliminaron. En realizaciones alternativas (denominados PreF\_V1 y PreF\_V2), una parte inmunológicamente activa (por ejemplo, aminoácidos 149-229) de la proteína G del VSR se añadió al dominio C-terminal.

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

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

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

La elución combinada de la etapa Q (~ 130 ml) se sometió a intercambio de tampón en fosfato 10 mM, pH 7,0 usando el sistema TFF a escala experimental de Millipore con el casete de membrana Pellicon XL PSE Biomax 100 (MWCO 10.000 Da). El material de Resultante tenía un pH de 7,0 y una conductividad de 1,8 mS/cm. Se cargaron 100 ml de esta muestra a 5 ml/min en 10 ml de un gel (XK 16, altura = 5 cm) de Hidroxiapatita de Tipo II (HA TII) equilibrada con tampón de PO<sub>4</sub> (Na) 10 mM a pH 7,0. Después de lavar la columna con el tampón de partida, la elución se realizó con un gradiente de PO<sub>4</sub> (Na) de 10 mM a 200 mM a pH 7,0 en 20 volúmenes de columna. Las fracciones se analizaron de nuevo en SDS PAGE con tinción de plata y azul de Coomassie y las fracciones positivas se combinaron.

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

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

La proteína recombinante PreF producida en células CHO se caracterizó mediante fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AFF-MALS) y se comparó con un antígeno químico que incluía componentes de las proteínas F y G del VRS. AFF-MALS permite la separación de especies de proteínas de acuerdo con su tamaño molecular en un

flujo de líquido con interacción de matriz mínima y análisis adicional mediante dispersión de luz multiángulo para la determinación exacta del peso molecular. La FIG. 2A muestra que más de un 65 % del material de FG purificado se encuentra en forma de oligómeros de alto peso molecular (1000-100 000 KDa) en su tampón final de PBS, mientras que un 3 % permanece en forma monomérica.

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

10 La proteína PreF purificada también se reticuló con glutaraldehído con la doble finalidad de confirmar la naturaleza soluble de la proteína en solución de tampón fosfato y para generar agregados para evaluación comparativa *in vivo* con proteína FG (véase el Ejemplo 7 que sigue a continuación). La reticulación con glutaraldehído se conoce porque proporciona una buena evaluación de la estructura cuaternaria de una proteína, y se describe en (Biochemistry, 36: 10230-10239 (1997); Eur. J. Biochem., 271: 4284-4292 (2004)).

15 La proteína se incubó con un 1 %, 2 % y 5 % de agente de reticulación con glutaraldehído durante 4 horas a 4 °C y la reacción se bloqueó mediante la adición de NaBH<sub>4</sub>. El exceso de glutaraldehído se retiró por desalación de la columna en tampón PBS. La proteína resultante se cuantificó por absorbancia a 280 nm y se evaluó por SDS PAGE en condiciones de desnaturalización y reducción. Se determinó que la mayor parte del PreF recombinante purificado se determinó migraba como un trímero en solución de PBS. El aumento de la temperatura de incubación a 23 °C era necesario para convertir la mayor parte de la proteína trimérica en agregados de alto peso molecular, tal como se confirma por SDS PAGE.

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

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

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

#### Ejemplo 5: El antígeno de PreF es inmunogénico

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

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

absorbancia para cada pocillo se detectaron a 450 nm con un lector de microplacas de Molecular Devices (Molecular Devices, USA).

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

#### 5 **Ejemplo 6: PreF induce anticuerpos de neutralización**

La presencia y cantidad de anticuerpos de neutralización se evaluó en muestras de suero de ratones inmunizados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Los sueros combinados de animales inmunizados se diluyeron en serie desde una dilución de partida de 1:8 en medios de VSR en placas de 96 pocillos (20 µl/pocillos). Los pocillos de control contenían medio de VSR solamente, o anticuerpo anti-VSR de cabra a 1:50 (Bioscience international). Se añadieron 500-1000 dosis infecciosas de una cepa A o B del VSR representativa a los pocillos, y las placas se incubaron durante 20 minutos a 33 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, antes de transferir la mezcla a placas de fondo plano de 96 pocillos sembradas previamente con  $1 \times 10^5$  células/ml de células Vero. Las células se incubaron durante aproximadamente 2 horas a 33 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, antes de incubación durante 5-6 días a la misma temperatura. Los sobrenadantes se retiraron; las placas se lavaron con PBS y las células de adherencia se fijaron con paraformaldehído al 1 % en PBS durante 1 hora, seguido de inmunofluorescencia indirecta (IFA) usando un anticuerpo primario anti VSR de cabra e IgG-FITC anti-cabra para detección.

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

#### 20 **Ejemplo 7: PreF protege frente a la estimulación con VSR**

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

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

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

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

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

#### Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1

50 Secuencia de nucleótidos que codifica la Cepa de proteína de Fusión de referencia del VSR con N.º de Referencia en GenBank U50362



MSKNKDQRTAKTLEKTWDTLNHLFFISSGLYKLNLSIAQITLSILAMIISTSLIITAIIFIASANHKVTLT  
 TAI IQDATSQIKNTPTYLTQDPQLGISFSNLSEITSQTTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTTTQTQPS  
 KPTTKQRQNKPPNKNDFHFEVFNFPVPCISCSNNTCWAICKRIPNKKPGKTTTTKPTKPTFKTTKKDLK  
 PQTTPKEVPTTKPTEEPTINTTKNITTTLLTNNTTGNPKLTSQMETFHSTSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQ  
 PSSPNTTRQ

**SEQ ID NO: 5**

Secuencia de nucleótidos de análogo de PreF optimizado para CHO

5  
 aagcttgccaccatggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgaccctg  
 tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaggagtctaccagtcacctgctccgccgtgtccaagggctac  
 ctgtccgccctgcgaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaag  
 tgcaacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa  
 ctccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagttctgggcttctgctgggctgggctcc  
 gccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcc  
 ctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgctgctccgtgctgacctccaaggtgctggt  
 ctgaagaactacatcgacaagcagctgctgctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgag  
 accgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgccggc  
 gtgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatc  
 accaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcccagcagtcctacagcatcatgagc  
 atcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgctgatcgacacccttgctgg  
 aagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgctgaccggaccgac  
 cggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttctccctctggccgagacctgcaaggtgcagtc  
 aaccgggtgttctgcgacacctgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatc  
 ttcaaccccaagtagcactgcaagatcatgaccagcaagaccgagctgtcctccagcgtgatcacctccctg  
 ggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagacc  
 ttctccaacggctgcgactacgtgtccaataaggcgctggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactac  
 gtgaataagcaggagggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtg  
 ttcccttccgacgagttcgacgctccatcgaccaggtgaacgagaagatcaaccagtccttggccttcatc  
 cggagctccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatc  
 gagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggcctgataatctaga

**SEQ ID NO: 6**

Secuencia de aminoácidos de análogo de PreF

10  
 MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT  
 DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLST  
 NKAVVLSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTP  
 VSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT  
 SPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLNIDIFNPK  
 YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQ  
 EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI  
 ARIKKLIGEA

**SEQ ID NO: 7**

Secuencia de nucleótidos que codifica PreFG\_V1 optimizado para CHO

15  
 aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgaccctg  
 tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagtctaccagtcacctgctccgccgtgtccaagggctac  
 ctgtccgccctgcgaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaag  
 tgcaacggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa  
 ctccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttctgctgggctggg  
 tccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagc  
 gccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgctgctccgtgctgacctccaaggtgctg  
 gatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatc  
 gagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgcc  
 ggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgcct  
 atcaccacgaccaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcccagcagtcctacagcatcatg  
 agcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgctgatcgacaccccttg  
 tggagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaaggagggtccaacatctgctgacctgaccggacc  
 gaccggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttctccctctggccgagacctgcaaggtgcag

tccaaccgggtgttctgcgacacccatgaactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgac  
atcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcc  
ctgggocccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgctccaacaagaaccggggaatcatcaag  
accttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtac  
tacgtgaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgaccctctg  
gtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtccttggccttc  
atccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccac  
atcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggctggcggctctggcggcagcggcggtcc  
aagcagcggcagaacaagcctcctaacaagcccaacaacgacttccacttccgaggtgttcaacttctgtgct  
tgcctcatctgctccaacaaccctacctgctgggcatctgcaagagaatccccaacaagaagcctgggaag  
aaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccaca  
aagcctaaggaagtgccaaccaccaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

SEQ ID NO: 8

Péptido PreFG\_V1 para CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT  
DAVKLIKQELDKYKSAVTELOLLMQSTPATNKKFLGFLLVGSAIASGLAVSKVLHLEGEVNIKISALLS  
TNKAVVLSLNGVSVLTSKVLDLKNIIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
PVSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWKLH  
TSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNP  
KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKTCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVYVVK  
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE  
IARIKKLIGEAGSGSGSGSKQRQNKPPNPNDFHFEVFNFPVPCSCSNNPTCWAICKRI PNKKPGKKT  
KPTKKPTFKTTTKDHPQTTPKPEVPTTK

5

SEQ ID NO: 9

PreF\_V2 para CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgcctgaccctg  
tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagtctaccagtcacctgctccgcctgtccaagggctac  
ctgtccgcctcgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaag  
tgcaacggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgcctgaccgaa  
ctccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttctgctgggctgaggc  
tccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagc  
gccctgctgtccaccaacaaggcctggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctcaaggtgctg  
gatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatc  
gagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgcc  
ggcgtgaccaccctgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgcct  
atcaccaacgaccaaanaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatg  
agcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccttgc  
tggaaagctgcacacctccccctgtgcaaccaacaaccaaagaggctccaacatctgcctgaccggacc  
gaccgggctggtactgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgag  
tccaaccgggtgttctgcgacacccatgaactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgac  
atcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcc  
ctgggocccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaag  
accttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtac  
tacgtgaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgaccctctg  
gtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtccttggccttc  
atccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccac  
atcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggctggcggcaagcagcggcagaacaagcct  
cctaacaagcccaacaacgacttccacttccaggtgttcaacttctgtgcttgcctccatctgctccaacaac  
cctacctgctgggcatctgcaagagaatccccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcctacc  
aagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaagcctaaggaagtgccaacc  
accaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

10

SEQ ID NO: 10

Péptido PreFG\_V2 para CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT  
DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLS  
TNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKHL  
TSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFFLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNP

KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGTKTKTASNKNRGI IKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK  
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLNVEDKIEEILSKIYHIENE  
IARIKKLIGEAGGKQRQNKPPNKNPNDHFHFEVFNFPVPCISCSNNPTCWAICKRI PNKKPGKKTTKPTKKPT  
FKTTKDHKPQTTKPKVPTTK

5 SEQ ID NO: 11  
Superenrollamiento a modo de ejemplo (cremallera de isoleucina)  
EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

10 SEQ ID NO: 12  
Polinucleótido CHO2 del antígeno PreF

atggagctgcccacctcgaagaccaacgccatcaccaccatcctcgccgctgacacctgtgcttcgccagc  
agccagaacatcacggaggagtctaccagagcagctgcagcgccgtgagcaagggctacctgagcgcgctg  
cgcacgggctggtacacgagcgtgatcacgatcgagctgagcaaatcaaggagaacaagtgaacggcagc  
gacgcgaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcggtgacggagctgcagctgctg  
atgcagagcagcgcggcgagcaacaacaagttcctcggtctcctgctggcgctgggcagcgcgatcgcgagc  
ggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagtcgcgctgctgagcagc  
aacaagggcgtgctgagcctgagcaacggcgtgagcgtgctgacgagcaaggtgctcgacctgaagaactac  
atcgacaagcagctgctgcccgatcgtgaacaagcagagctgcagcatcagcaacatcgagacctgacgag  
ttccagcagaagaacaaccgctgctggagatcacgcgggagttctccgtgaacgcaggcgtgacgacgccc  
gtgctctacgtacatgctgacgaacagcagcgtgctcagcctgatcaacgacatgccgatcacgaacgaccag  
aagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtgcccagcagagctacagcatcatgagcatcatcaaggag  
gaggtgctggcatacgtgggtgacgctgcccgtgtacggcgctcatcgacacgcccctgctggaagctgcacacg  
agcccgtgctgcacgaccaacacgaaggaggcagcaacatctgcctgacgcggacggaccggggctggtac  
tgcgacaacgcgggcagcgtgagcttcttcccgtcgcggagacgtgcaaggtgcagagcaaccgctcttc  
tgcgacacgatgaacagcctgacgctgcccagcagaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccgag  
tacgactgcaagatcatgacgagcaagaccgatgtcagcagcagcgtgatcacgagcctcggcgcgatcgtg  
agctgctacggcaagacgaagtgacggcgagcaacaagaaccgcgcatcatcaagacgttcagcaacggc  
tgcgactatgtgagcaacaagggcgtggacactgtgagcgtcggcaacacgctgtactacgtgaacaagcag  
gagggcaagagcctgtacgtgaagggcgagccgatcatcaacttctacgacctcgtgttcccagcgcac  
gagttcgacgcgagcatcagccaagtgaacgagaagatcaaccagagcctggcgttcatccgcaagagcgcac  
gagaagctgcacaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatc  
gcgcgatcaagaagctgatcggcgagggcgcgatcatcaccatcaccattga

15 SEQ ID NO: 13  
Polinucleótido del antígeno PreF con intrón

# ES 2 719 406 T3

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgaccctgtgcttcgcctcc  
tcccagaacatcaccgaggagtctaccagtccacctgctccgccgtgtccaagggctacctgtccgcctg  
cggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgcaacggcacc  
gacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcctgaccgaactccagctgctg  
atgcagtcacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttctgctggggctgggctccgccatcgctcc  
ggcatcgccgtgagcaaggtacgtgctgggacttggttccccttttttaataaaaagtataatctttaat  
gttatatacatatcttctgtatgtgatccatgtgcttatgactttgtttatcatgtgttttaggtgctgcacc  
tggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgctccctgtccaacg  
gctgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtga  
acaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctgg  
agatcaccgcgagttctccgtgaacgcggcgtgaccacctgtgtccacctacatgctgaccaactccg  
agctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaactgatgtccaacaacgtgcaga  
tcgtgcccgcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgc  
ctctgtacggcgtgatcgacaccttgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaaccaag  
agggctccaacatgctgacctgaccggaccgaccggggctggtactgcaaacgcgggctccgtgctccttct  
tccctctggccgagacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtagactgcaagatcatgaccagcaaga  
cctccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtagactgcaagatcatgaccagcaaga  
ccgacgtgctcctccagcgtgatcacctccctggggcgcctcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccg  
cctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcaactacgtgtccaataagggcgtgg  
acaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaagagcctgtacgtgaagggcg  
agcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgctccatcagccagggtga  
acgagaagatcaaccagtccttggccttcatccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaaga  
tcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccgatcaagaagctgatcggcgagg  
ccggaggtcaccaccacctcaccactga

SEQ ID NO: 14 Secuencia sintética de engarce  
GGSGGSGGS

5

SEQ ID NO: 15 Sitio de escisión de furina  
RARR

10

SEQ ID NO: 16 Sitio de escisión de furina  
RKRR

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A. ID Corporación Biomédica de Quebec BAUDOUX, Guy J-M BLAIS,  
Normand Rheault, Patrick RUELLE, Jean-Louis

15

<120> Antígeno recombinante

<130>VU62788

<150> 61/016,524

<151> 24-12-2007

20

<150> 61/056,206

<151> 2008-05-27

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1697

25

<212> ADN

<213> virus sincitial respiratorio

<400> 1

ES 2 719 406 T3

atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt 60  
gttttgcttc tgggtcaaac atcactgaag aatthttatca atcaacatgc agtgcagtag 120  
caaaggctat cttagtgtc tgagaactgg ttggtatacc agtgttataa ctatagatta 180  
agtaatatca aggaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag 240  
aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcaccacagc 300  
aacaacaat cgagccagaa gagaactacc aaggthttatg aattatacac tcaaaatgcc 360  
aaaaaacca atgtaacatt aagcaagaaa aggaaaagaa gatttcttgg tttttgtag 420  
gtgttgatc tgcaatcgcc agtggcgttg ctgtatctaa ggtcctgcac ctgaagggga 480  
agtgaacaag atcaaaagtg ctctactatc cacaacaag gctgtagtca gttatcaaatt 540  
ggagttagtg tottaaccag caaagtgtta gacctcaaaa actatataga aaacaattgt 600  
tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agcaactgta tagagttcca 660  
acaaaagaac aacagactac tagagattac caggggaattt agtgtaagc aggtgtaact 720  
acacctgtaa gcacttacat gttaactaat agtgaattat tgcattatc aatgatatgc 780  
ctataacaaa tgatcagaaa aagttaattgt ccaacaattgt tcaaatgta gacagcaaag 840  
ttactctatc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtgtaca attaccacta 900  
tatggtgtta tagatacacc ctggtgaaa ctacacacat cccctatgt acaaccaaca 960  
caaaagaagg gtccaacatc tgtttaacaa gaactgacag aggtggtact gtgacaatgc 1020  
-  
aggatcagta tctttcttcc cacaagctga aacatgtaaa gtcaatcaa tcgagtattt 1080  
tgtgacacaa tgaacagttt aacattacca agtgaagtaa actctgcaat gttgacatat 1140  
tcaaccocaa atatgattgt aaaattatga cttcaaaaac gatgtaagca gctccgttat 1200  
cacatctcta ggagccattg tgtcatgcta tggcaaaaaca aatgtacagc atccaataaa 1260  
aatcgtggaa tcataaagac atthttctaac ggggtgcgata tgtatcaaatt aaaggggtgg 1320  
acactgtgtc tgtaggtaac acattatatt atgtaaaaag caagaaggta aaagtctcta 1380  
tgtaaaagggt gaaccaataa taaatttcta tgacccttag tattccctc tgatgaattt 1440  
gatgatcaa tatctcaagt caacgagaag attaacagag cctagcattt attcgtaaat 1500  
ccgatgaatt attacataat gtaaattgctg gtaatccacc ataaatatca tgataactac 1560  
tataattata gtgattatag taatattgtt atcttaattg ctggtggact gctcttatac 1620  
tgtaaggcca gaagcacacc agtcacacta agaagatca actgagtgggt ataaataata 1680  
ttgcatttag taactaa 1697

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

ES 2 719 406 T3

<400>2

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

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

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

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

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

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

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

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr  
 115 120 125

ES 2 719 406 T3

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val  
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu  
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys  
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val  
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 719 406 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210>3  
 <211> 897  
 <212> ADN  
 <213> virus sincitial respiratorio

5

<400>3

ES 2 719 406 T3

atgtccaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagacctg ggacactctc 60  
aatcatttat tattcatatc atcgggctta tataagttaa atcttaaadc tatagcacia 120  
atcacattat ccattctggc aatgataadc tcaacttcac ttataattac agccatcata 180  
ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ctaacaactg caatcataca agatgcaaca 240  
agccagatca agaacacaac cccaacatac ctactcagg atcctcagct tggaatcagc 300  
ttctccaadc tgtctgaaat tacatcacia accaccacca tactagcttc aacaacacca 360  
ggagtcaagt caaacctgca acccaciaa gtcaagacta aaaacacaac aacaacccaa 420  
acacaaccca gcaagcccac taaaaaacia cgcataaaca aaccaccaa caaacccaat 480  
aatgattttc acttcgaagt gtttaacttt gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca 540  
acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc 600  
aagcctacia aaaaaccaac cttcaagaca accaaaaag atctcaaacc tcaaaccact 660  
aaaccaaagg aagtaccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccaccaa 720  
acaaacatca caactacact gtcaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt 780  
caaatgaaa ccttccaetc aacctcctcc gaaggcaate taagcccttc tcaagtctcc 840  
acaacatccg agcaccatc acaaccctca tctccacca acacaacacg ccagtag 897

<210>4  
<211> 298  
<212> PRT  
<213> virus sincitial respiratorio  
<400> 4

5

ES 2 719 406 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 719 406 T3

-

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

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

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys  
 165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys  
 180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe  
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

<210>5  
 <211> 1566  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido de PreF recombinante  
 <400>5

ES 2 719 406 T3

aagcttgcca ccatggagct gctgatcctg aaaaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60  
gccgtgacct tgtgcttcgc ctctcccag aacatcaccg aggagttcta ccagtccacc 120  
tgctccgccc tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccgctggta cacctccgtg 180  
atcaccatcg agctgtccaa catcaaggaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaggtg 240  
aagctgatca agcaggagct ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300  
  
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag tttctgggct tcctgctggg cgtgggctcc 360  
gccatgcct ccggcatcgc cgtgagcaag gtgctgcacc tggagggcga ggtgaacaag 420  
atcaagagcg ccctgctgtc caccaacaag gccctgggtg ccctgtccaa cggcgtgtcc 480  
gtgctgacct ccaaggtgct ggatctgaag aactacatcg acaagcagct gctgcctatc 540  
gtgaacaagc agtcctgtc catctccaac atcgagaccg tgatcgagtt ccagcagaag 600  
aacaaccggc tgctggagat caccgcgag ttctccgtga acgccggcgt gaccaccct 660  
gtgtccacct acatgctgac caactccgag ctgctgtccc tgatcaacga catgcctatc 720  
accaacgacc agaaaaaact gatgtccaac aacgtgcaga tcgtgcccga gcagtcctac 780  
agcatcatga gcatcatcaa ggaagaggtg ctggcctacg tggcagct gcctctgtac 840  
ggcgtgatcg acacccttg ctggaagctg cacacctccc ccctgtgcac caccaacacc 900  
aaggagggct ccaacatctg cctgaccgg accgaccggg gctggtactg cgacaacgcc 960  
ggctccgtgt ccttcttccc tctggccgag acctgcaagg tgcagtccaa ccgggtgttc 1020  
tgcgacacca tgaactccct gaccctgcct tccgaggtga acctgtgcaa catcgacatc 1080  
ttcaacccca agtacgactg caagatcatg accagcaaga ccgacgtgtc ctccagcgtg 1140  
atcacctccc tgggcccatt cgtgtcctgc tacggcaaga ccaagtgcac cgctccaac 1200  
aagaaccggg gaatcatcaa gaccttctcc aacggctgcg actacgtgtc caataagggc 1260  
gtggacaccg tgtccgtggg caacacactg tactacgtga ataagcagga gggcaagagc 1320  
ctgtacgtga agggcgagcc tatcatcaac ttctacgacc ctctgggtgt cccttccgac 1380  
gagttcgacg cctccatcag ccaggtgaac gagaagatca accagtcctt gccttcatc 1440  
cggaagtccg acgagaagct gcataacgtg gaggacaaga tcgaggagat cctgtccaaa 1500  
atctaccaca tcgagaacga gatcgcccgg atcaagaagc tgatcggcga ggctgataa 1560  
tctaga 1566

<210>6  
<211> 514  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

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



ES 2 719 406 T3

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu  
 35 40 45  
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile  
 50 55 60  
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
 85 90 95  
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu  
 100 105 110  
 Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu  
 115 120 125  
 His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr  
 130 135 140  
 Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile  
 165 170 175  
 Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu  
 180 185 190  
 Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser  
 195 200 205  
 Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn  
 210 215 220  
 Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr  
 245 250 255  
 Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln  
 260 265 270  
 Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr  
 275 280 285

ES 2 719 406 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala

<210>7  
 <211> 1855  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 719 406 T3

<220>

<223> Secuencia polinucleotídica de antígeno de PreF-G quimérico

<400>7

```

aagcttgcca ccatggagct gctgatcctc aagaccaacg ccatcacogc catcctggcc      60
gccgtgacco tgtgcttcgc ctctcccag aacatcacog aagagttota ccagtccacc      120
tgctcogccg tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgogga cggctggta cacctccgtg      180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaggtc      240
aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg      300
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttctgct gggcgtgggc      360
tccgccatcg cctccggcat cgccgtgagc aaggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac      420
aagatcaaga ggcctctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgtccctgtc caacggcgtg      480
tccgtgctga cctccaaggt gctggatctg aagaactaca togacaagca gctgctgcct      540
atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag      600
aagaacaacc ggctgctgga gatcacccgc gagttctccg tgaacgccgg cgtgaccacc      660
cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct cctgatcaa cgacatgect      720
atcaccaacg accaaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc      780
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtctggcct acgtcgtgca gctgctctg      840
tacggcgtga tcgacaccoc ttgctggaag ctgcacacct cccctctgtg caccaccaac      900
accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac      960
gccggctccg tgtctctctt ccctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg     1020
ttctgcgaca ccatgaactc cctgaccctg ctttccgagg tgaacctgtg caacatcgac     1080
atcttcaacc ocaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtctctccagc     1140
gtgatcacct ccctgggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc     1200
aacaagaacc ggggaatcat caagacctc tccaacggct gogactacgt gtccaataag     1260
ggcgtggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag     1320
agcctgtacg tgaagggcga gcctatcatc aacttctacg accctctggt gttcccttcc     1380
gacgagttcg acgcctccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc     1440
atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc     1500
aaaatctacc acatcgagaa cgagatcgcc cggatcaaga agctgatogg cgaggctggc     1560
ggctctggcg gcagcggcgg ctccaagcag cggcagaaca agcctcctaa caagoccaac     1620
aacgacttcc acttcgaggt gttcaacttc gtgccttgct ccatctgctc caacaacctt     1680
acctgctggg ccatctgcaa gagaatcccc aacaagaagc ctggcaagaa aaccaccacc     1740
aagcctacca agaagcctac cttcaagacc accaagaagg accacaagcc tcagaccaca     1800
aagcctaagg aagtgcacaac caccaagcac caccaccatc accactgata atcta         1855

```

ES 2 719 406 T3

<210>8  
 <211> 605  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Polipéptido de PreF-G quimérico

<400>8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 719 406 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 719 406 T3

435	440	445
Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser 450 455 460		
Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser 465 470 475 480		
Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser 485 490 495		
Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile 500 505 510		
Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys Gln Arg Gln 515 520 525		
Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe 530 535 540		
Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala 545 550 555 560		
Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr 565 570 575		
Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys 580 585 590		
Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys 595 600 605		

<210>9  
 <211> 1834  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polinucleótido de PreF-G quimérico  
 <400> 9

ES 2 719 406 T3

aagcttgcca ccatggagct gctgatcctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60  
gccgtgacct tgtgcttgcg ctctcccag aacatcaccg aagagttcta ccagtccacc 120  
tgctccgcg tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg 180  
atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaggtc 240  
aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300  
atgcagtcca ccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttcctgct gggcgtgggc 360  
tccgccatcg cctccggcat cgccgtgagc aaggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac 420  
aagatcaaga gcgccctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgtccctgtc caacggcgtg 480  
tccgtgctga cctccaaggt gctggatctg aagaactaca tggacaagca gctgctgctt 540  
atcgtgaaca agcagtctcg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag 600  
aagaacaacc ggctgctgga gatcaccgcg gagttctccg tgaacgccgg cgtgaccacc 660  
cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct cctgatcaa cgacatgcct 720  
atcaccaacg accaaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtcc 780  
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtcttgccct acgtcgtgca gctgcctctg 840  
tacggcgtga tggacacccc ttgctggaag ctgcacacct cccccctgtg caccaccaac 900  
accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac 960  
gccggtccg tgtccttctt ccctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg 1020  
ttctgcgaca ccatgaactc cctgaccctg ccttccgagg tgaacctgtg caacatcgac 1080  
atcttcaacc ccaagtaaga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtctccagc 1140  
gtgatcacct ccctggggcg catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc 1200  
aacaagaacc ggggaatcat caagacctc tccaacggct ggcactacgt gtccaataag 1260  
ggcgtggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag 1320  
agcctgtacg tgaagggcga gcctatcatc aacttctacg accctctggt gttcccttcc 1380  
gacgagttcg acgcctocat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc 1440  
atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc 1500  
aaaatctacc acatcgagaa cgagatcgcc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc 1560  
ggcaagcagc ggcaagaaca gcctcctaac aagcccaaca acgacttcca cttcgagggtg 1620  
ttcaacttcg tgcttgctc catctgctcc aacaacccta cctgctgggc catctgcaag 1680  
agaatccca acaagaagcc tggcaagaaa accaccacca agcctaccaa gaagcctacc 1740  
ttcaagacca ccaagaagga ccacaagcct cagaccacaa agcctaagga agtgccaacc 1800  
accaagcacc accaccatca ccaactgataa tcta 1834

<210> 10  
<211> 598

ES 2 719 406 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de PreF-G quimérico

5

<400> 10

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

ES 2 719 406 T3

1				5						10					15
Ala	Val	Thr	Leu	Cys	Phe	Ala	Ser	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
	50					55					60				
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70					75					80
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu
				85					90					95	
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Asn	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu
			100					105					110		
Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Val
		115					120					125			
Leu	His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser
	130					135					140				
Thr	Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr
145					150					155					160
Ser	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro
				165					170					175	
Ile	Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile
			180					185					190		
Glu	Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe
		195					200					205			
Ser	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr
	210					215					220				
Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp
225					230					235					240
Gln	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser
				245					250					255	

ES 2 719 406 T3

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val  
 260 265 270  
 Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His  
 275 280 285  
 Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys  
 290 295 300  
 Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val  
 305 310 315 320  
 Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val  
 325 330 335  
 Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu  
 340 345 350  
 Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr  
 355 360 365  
 Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile  
 370 375 380  
 Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg  
 385 390 395 400  
 Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys  
 405 410 415  
 Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys  
 420 425 430  
 Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe  
 435 440 445  
 Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser  
 450 455 460  
 Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser  
 465 470 475 480  
 Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser  
 485 490 495  
 Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile  
 500 505 510

ES 2 719 406 T3

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

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

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

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

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

Glu Val Pro Thr Thr Lys  
 595

- <210> 11
- <211> 28
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cremallera de leucina de GCN4 sustituida con isoleucina
- <400> 11

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

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

- 10 <210> 12
- <211> 1563
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Secuencia de nucleótidos de PreF con codones optimizados
- <400> 12

ES 2 719 406 T3

atggagctgc ccatacctgaa gaccaacgcc atcaccacca tcctcgcgcg cgtgaccctg 60  
 tgcttcgcca gcagccagaa catcacggag gagttctacc agagcacgtg cagcgcctgt 120  
 agcaagggtt acctgagcgc gctgcgcacg ggctggtaca cgagcgtgat cacgatcgag 180  
 ctgagcaaca tcaaggagaa caagtgcaac ggcacggacg cgaaggtgaa gctgatcaag 240  
 caggagctgg acaagtacaa gagcgcggtg acggagctgc agctgctgat gcagagcacg 300  
 ccggcgacga acaacaagtt cctcggcttc ctgctgggcg tgggcagcgc gatcgcgagc 360  
  
 ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagtccgcg 420  
 ctgctgagca cgaacaaggc ggtcgtgagc ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgacgagc 480  
 aagggtgctc acctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgccgatcgt gaacaagcag 540  
 agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccgcctg 600  
 ctggagatca cgcgggagtt ctccgtgaac gcaggcgtga cgacgcccgt gtctacgtac 660  
 atgctgacga acagcgagct gctcagcctg atcaacgaca tgccgatcac gaacgaccag 720  
 aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc gtgcgccagc agagctacag catcatgagc 780  
 atcatcaagg aggaggtgct ggcatacgtg gtgcagctgc cgctgtacgg cgtcatcgac 840  
 acgccctgct ggaagctgca cacgagcccg ctgtgcacga ccaacacgaa ggagggcagc 900  
 aacatctgcc tgacgcggac ggaccggggc tggtactgcg acaacgcggg cagcgtgagc 960  
 ttcttccgcg tcgcggagac gtgcaaggtg cagagcaacc gcgtcttctg cgacacgatg 1020  
 aacagcctga cgctgccgag cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccggaag 1080  
 tacgactgca agatcatgac gagcaagacc gatgtcagca gcagcgtgat cacgagcctc 1140  
 ggcgcgatcg tgagctgcta cggcaagacg aagtgcacgg cgagcaacaa gaaccgcggc 1200  
 atcatcaaga cgttcagcaa cggctgcgac tatgtgagca acaagggcgt ggacactgtg 1260  
 agcgtcggca acacgctgta ctacgtgaac aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag 1320  
 ggcgagccga tcatcaactt ctacgacccg ctcgtgttcc cgagcgacga gttcgacgcg 1380  
 agcatcagcc aagtgaacga gaagatcaac cagagcctgg cgttcatccg caagagcgac 1440  
 gagaagctgc acaacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgagcaagat ctaccacatc 1500  
 gagaacgaga tcgcgcgcat caagaagctg atcggcgagg cgcacatca ccatcaccat 1560  
 tga 1563

<210> 13  
 <211> 1685  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia polinucleotídica de PreF con intrón

<400> 13

ES 2 719 406 T3

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tccctggccgc cgtgaccctg 60  
 tgcttcgcct cctcccagaa catcacccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccctg 120  
 tccaagggct acctgtccgc cctgcccacc ggctgggtaca cctccgtgat caccatcgag 180  
 ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag 240  
 caggagctgg acaagtataa gagcgcctg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc 300  
  
 cctgccacca acaacaagtt totgggcttc ctgctggggcg tgggctccgc catcgcctcc 360  
 ggcatcgccg tgagcaaggt acgtgtccgg acttgtgttc cccttttttt aataaaaagt 420  
 tatacttta atggtatata catatttct gtatgtgatc catgtgctta tgactttgtt 480  
 tatcatgtgt ttaggtgctg cacctggagg gcgaggtgaa caagatcaag agcgcctctg 540  
 tgtccaccaa caaggccctg gtgtccctgt ccaacggcgt gtccgtgctg acctccaagg 600  
 tgctggatct gaagaactac atcgacaagc agctgctgcc tatcgtgaac aagcagtcct 660  
 gctccatctc caacatcgag accgtgatcg agttccagca gaagaacaac cggctgctgg 720  
 agatcaccgc cgagttctcc gtgaacgcgc gcgtgaccac ccctgtgtcc acctacatgc 780  
 tgaccaactc cgagctgctg tccctgatca acgacatgcc tatcaccaac gaccagaaaa 840  
 aactgatgtc caacaacgtg cagatcgtgc ggcagcagtc ctacagcatc atgagcatca 900  
 tcaaggaaga ggtgctggcc tacgtggtgc agctgcctct gtacggcgtg atcgacaccc 960  
 cttgctggaa gctgcacacc tccccctgt gcaccaccaa caccaaggag ggctccaaca 1020  
 tetgctgac ccggaccgac cggggctggt actgcgacaa cgcggctcc gtgtccttct 1080  
 tccctctggc cgagacctgc aagggtgcagt ccaaccgggt gttctgacac acctgaact 1140  
 ccctgacct gccttcgag gtgaacctgt gcaacatcga catcttcaac cccaagtacg 1200  
 actgcaagat catgaccagc aagaccgacg tgtcctccag cgtgatcacc tccctgggcg 1260  
 ccatcgtgtc ctgctacggc aagaccaagt gcaccgcctc caacaagaac cggggaatca 1320  
 tcaagacctt ctccaacggc tgcgactacg tgtccaataa gggcgtggac accgtgtccg 1380  
 tgggcaacac actgtactac gtgaataagc aggagggcaa gagcctgtac gtgaagggcg 1440  
 agcctatcat caacttctac gacctctgg tgttcccttc cgacgagttc gacgcctcca 1500  
 tcagccaggt gaacgagaag atcaaccagt ccctggcctt catccggaag tccgacgaga 1560  
 agctgcataa cgtggaggac aagatcgagg agatcctgtc caaaatctac cacatcgaga 1620  
 acgagatcgc ccggatcaag aagctgatcg gcgaggccgg aggtcaccac caccatcacc 1680  
 actga 1685

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 719 406 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido conector sintético Synthetic linker peptide

<400> 14

5

**Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser**  
**1 5**

<210> 15

<211>4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Motivo consenso de escisión de furina

<400> 15

**Arg Ala Arg Arg**  
**1**

15

<210> 16

<211>4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo consenso de escisión de furina

20

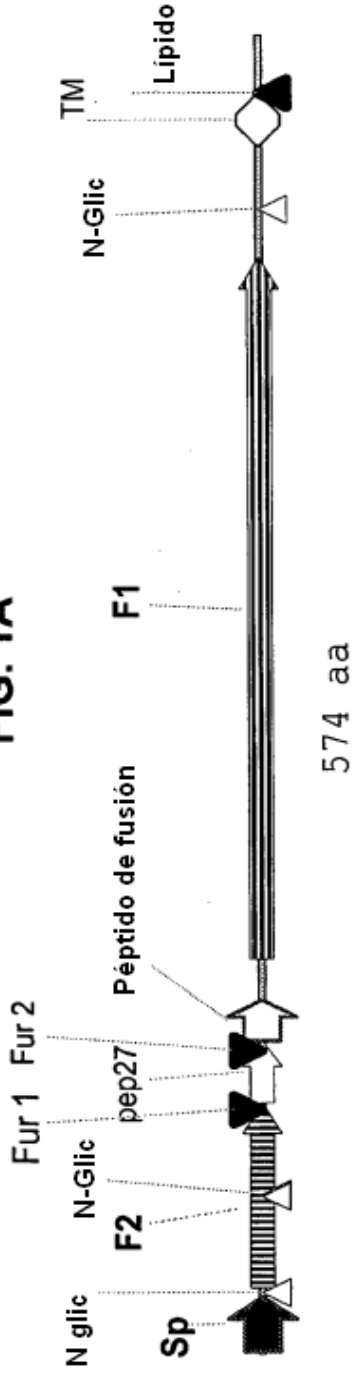
<400> 16

**Arg Lys Arg Arg**  
**1**

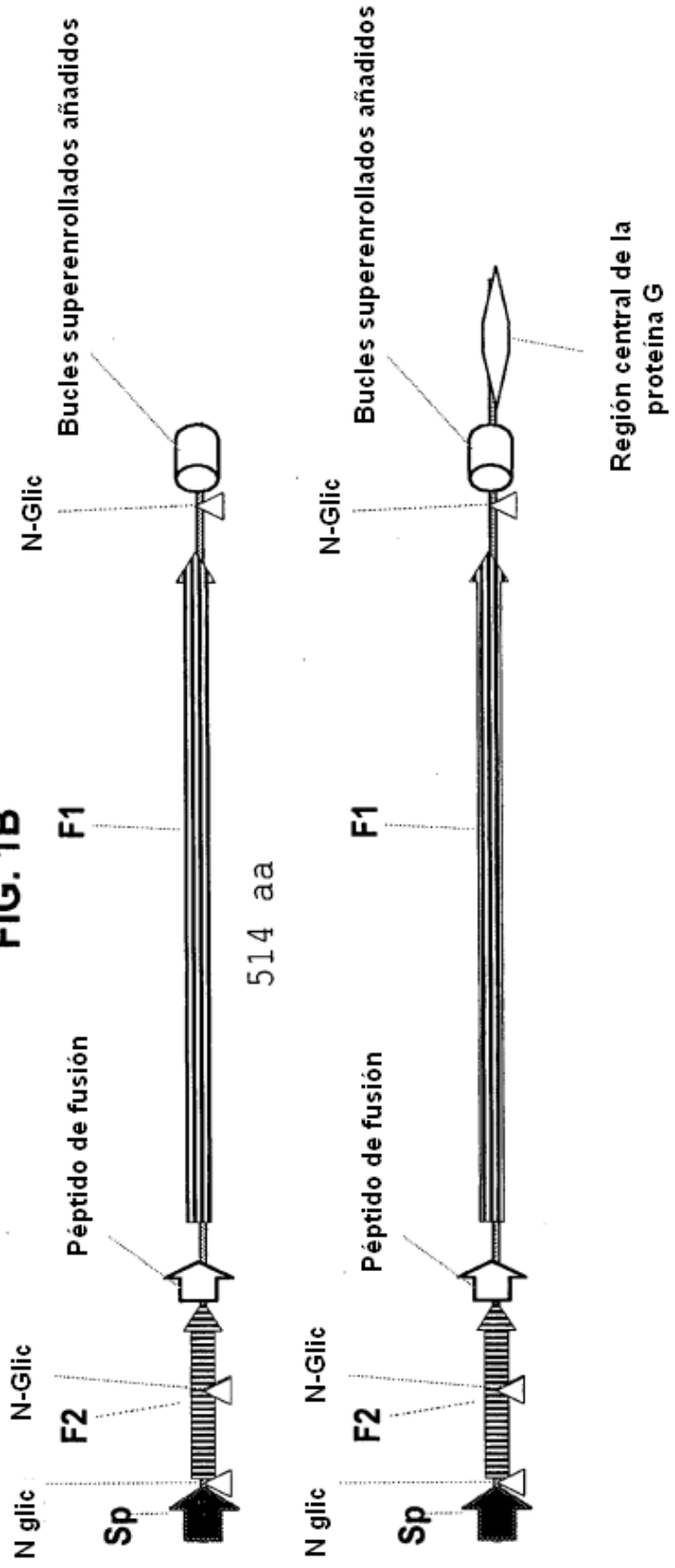
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un antígeno del virus sincitial respiratorio recombinante (VSR) que se ensambla en un trímero, que comprende un polipéptido de la proteína F soluble que comprende un dominio F<sub>2</sub> y un dominio F<sub>1</sub> de un polipéptido de la proteína F del VSR y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo en posición C-terminal con respecto al dominio F<sub>1</sub> que estabiliza la conformación de prefusión de la proteína F.
2. El antígeno del VSR recombinante de la reivindicación 1, que comprende además un péptido señal.
3. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el dominio de trimerización heterólogo comprende un dominio de bucles superenrollados.
- 10 4. Un ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Una composición inmunogénica que comprende el antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5 que comprende además un adyuvante.
- 15 7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6, en la que el adyuvante comprende al menos uno de: 3D-MPL, QS21, una emulsión de aceite en agua y alumbre.
8. El uso del antígeno del VSR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 4 en la preparación de un medicamento para tratar una infección por VSR.
- 20 9. El antígeno del VSR recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7 para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con el VSR.

**FIG. 1A**

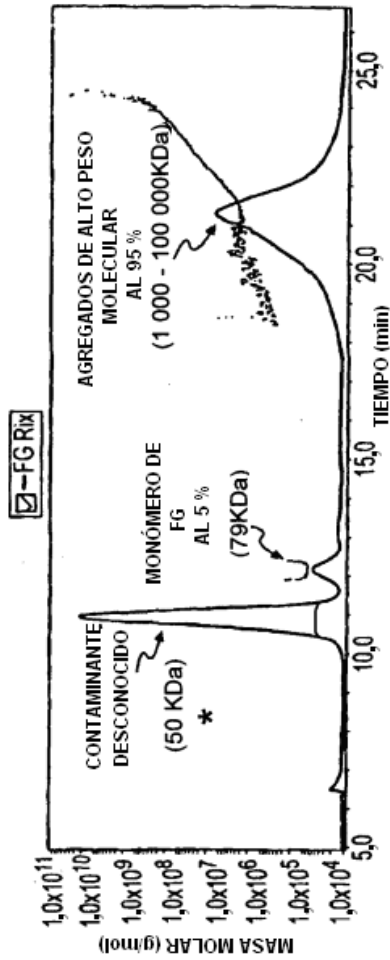


**FIG. 1B**



**FIG. 2**  
**Caracterización hidrodinámica de Pref y FG**

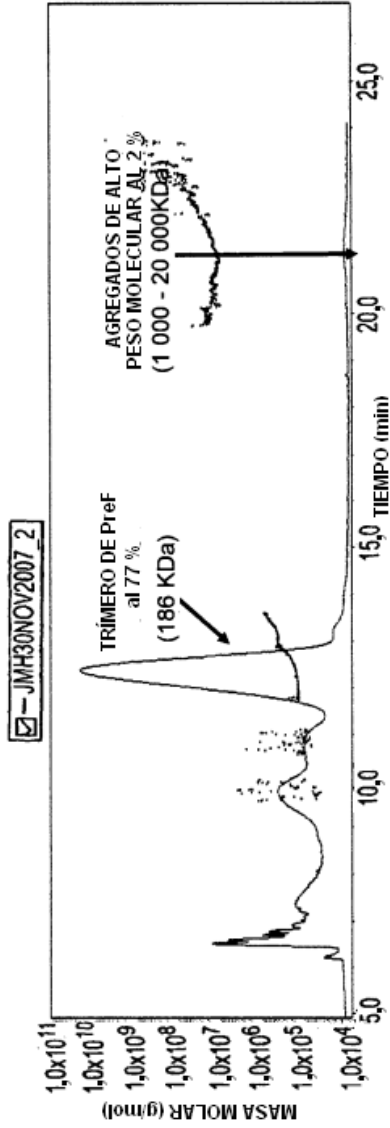
ELUCIÓN DE FG RIX MEDIANTE FFF-MALLS  
 INYECCIÓN DE 100 µl DE TAMPÓN; PBS 1X, pH 7,4



**FG**

\*COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR  
 DESCONOCIDO, DE MODO QUE  
 PROPORCIÓN DESCONOCIDA

ELUCIÓN DE Pref Abio MEDIANTE FFF-MALLS  
 INYECCIÓN DE 100 µl DE TAMPÓN; PBS 1X, pH 7,4



**Pref**

**FIG.3**  
**Inhibición de neutralización de sueros humanos con preF**  
**en comparación con FG**

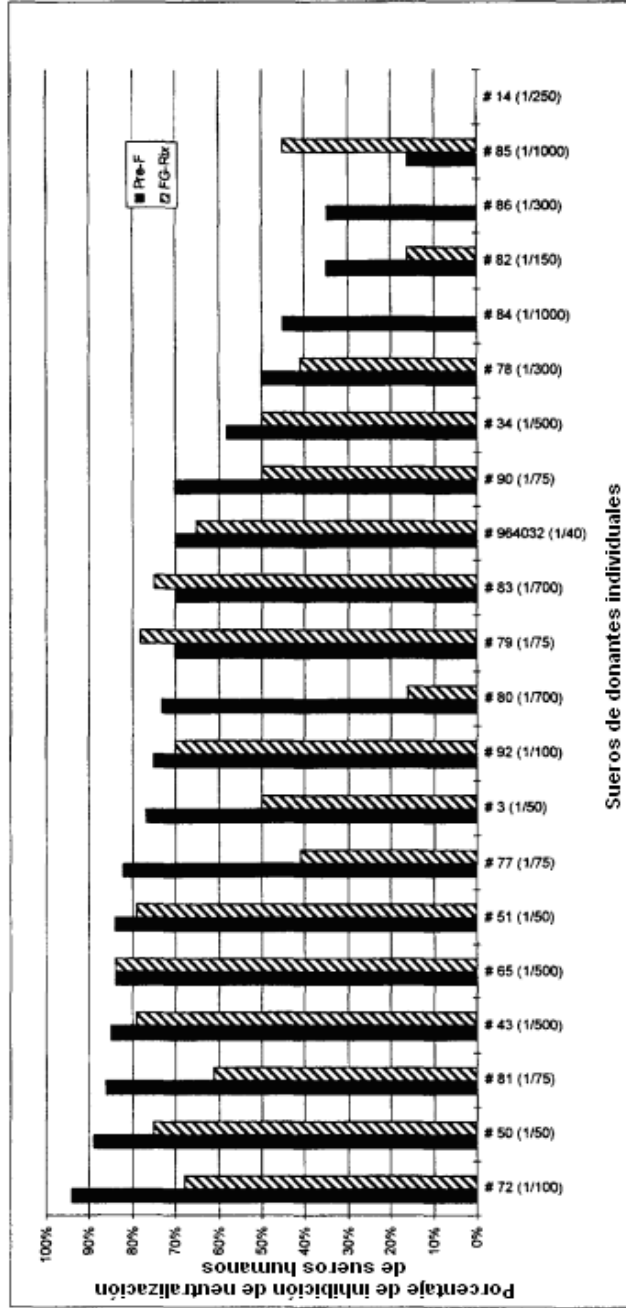
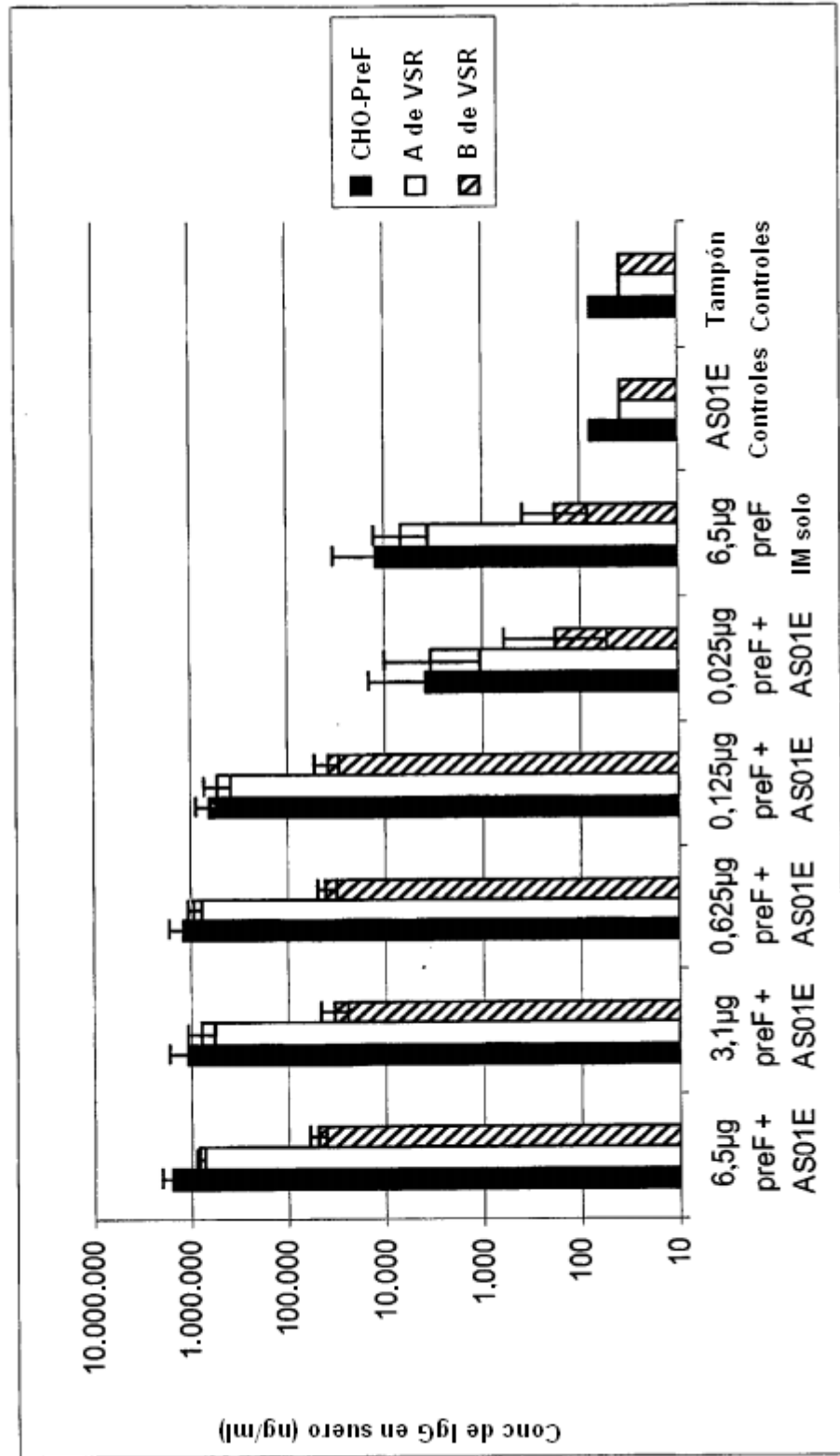
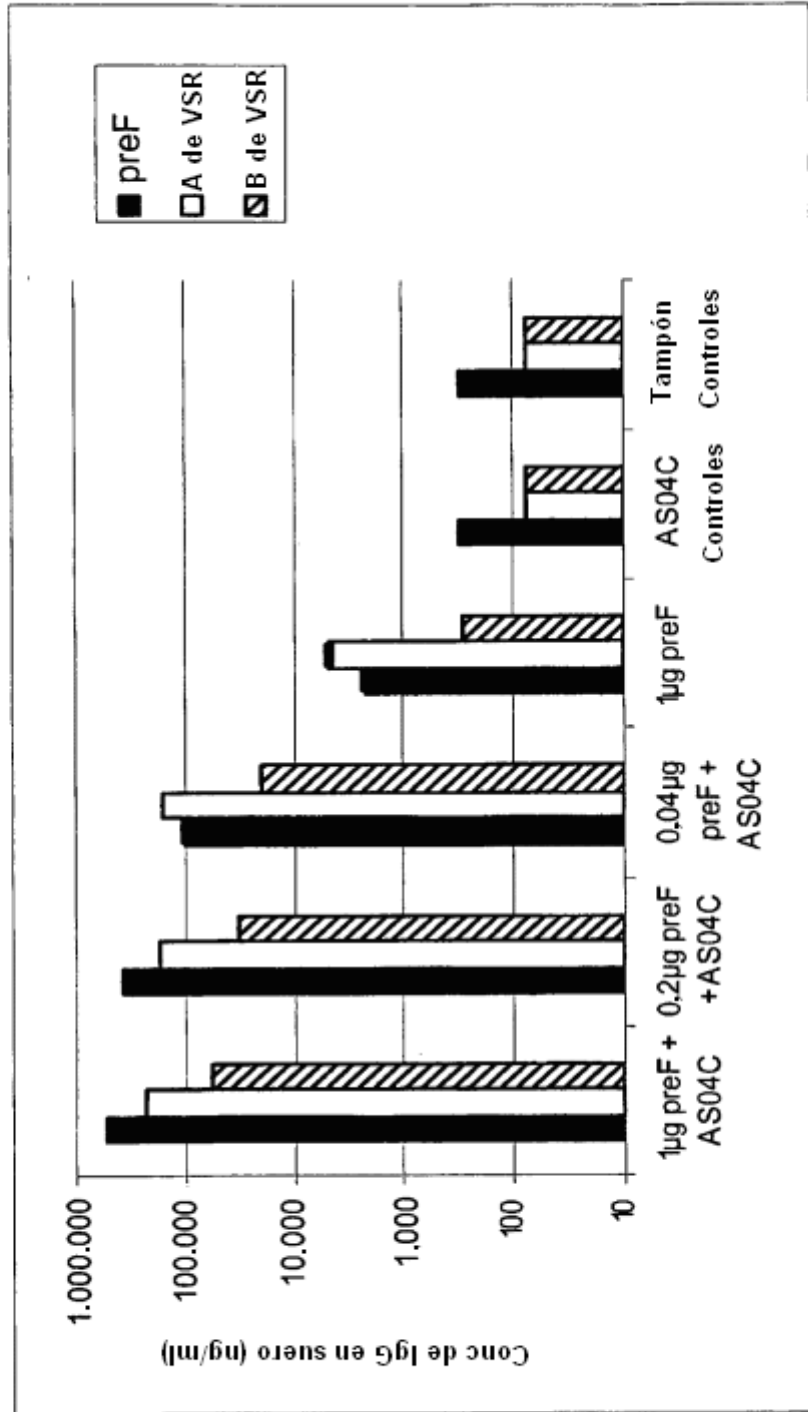


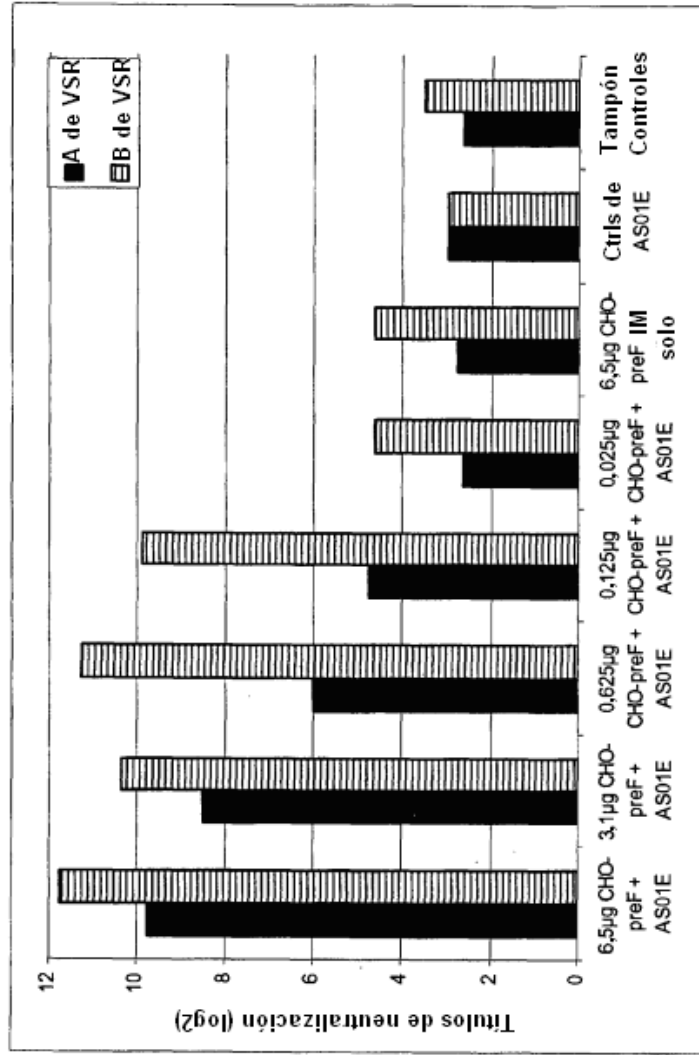
FIG. 4A  
 Serología en ratones inmunizados, CHO-PreF



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

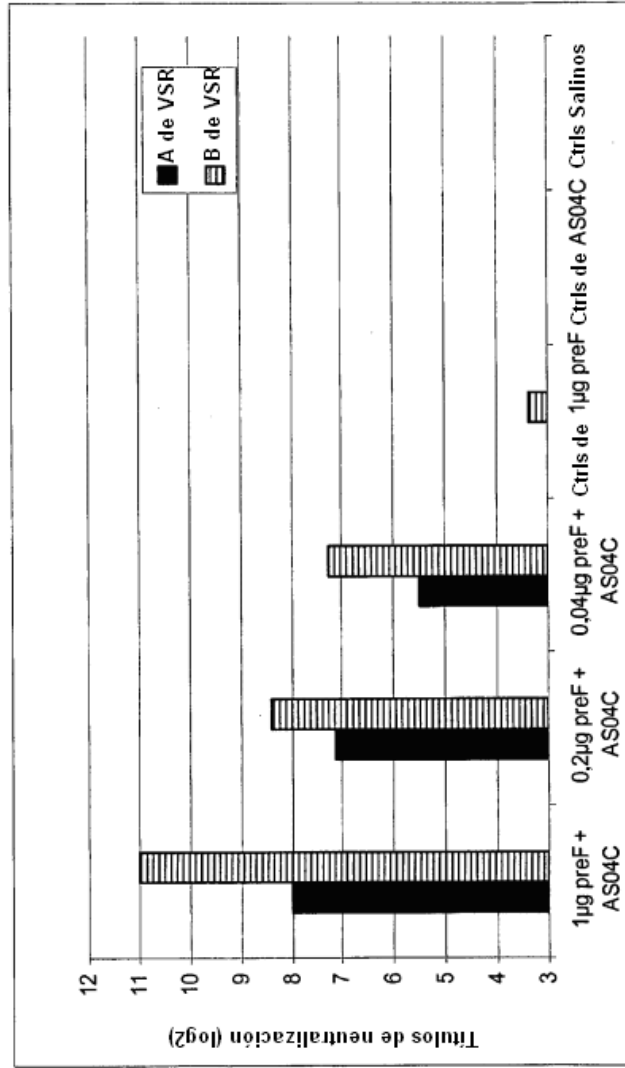


**FIG. 5A**  
**Evaluación de CHO-Pref in vivo**  
**Títulos de neutralización**



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

**FIG. 5B**  
**Evaluación de CHO-PreF in vivo**  
**Títulos de neutralización**



**FIG. 6A**  
**Protección de CHO-PreF frente a estimulación**

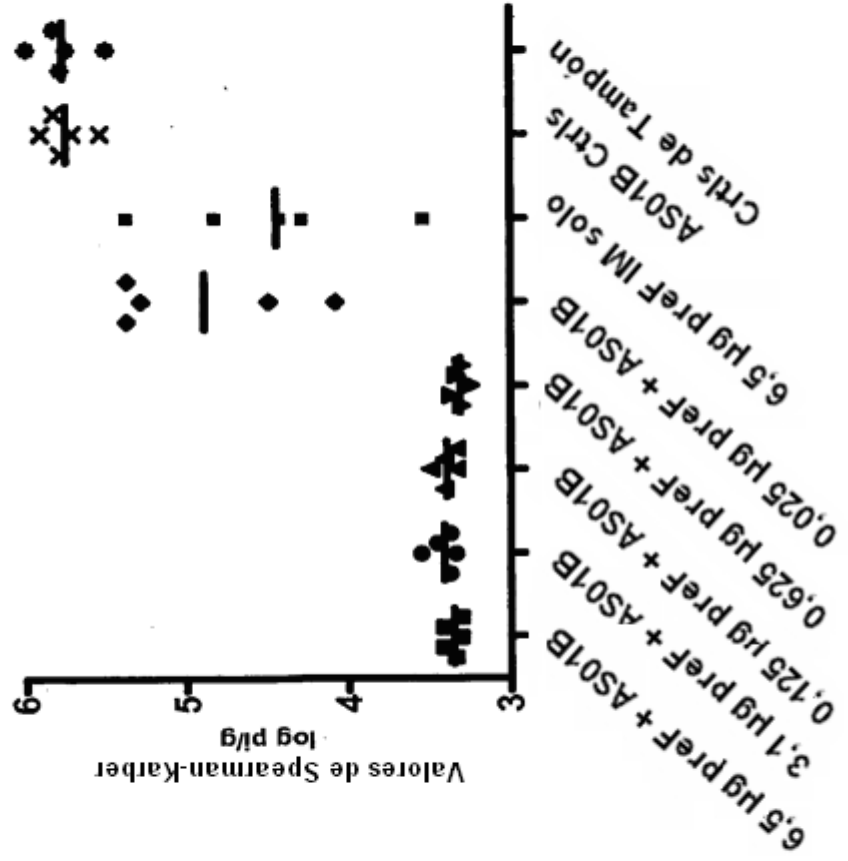
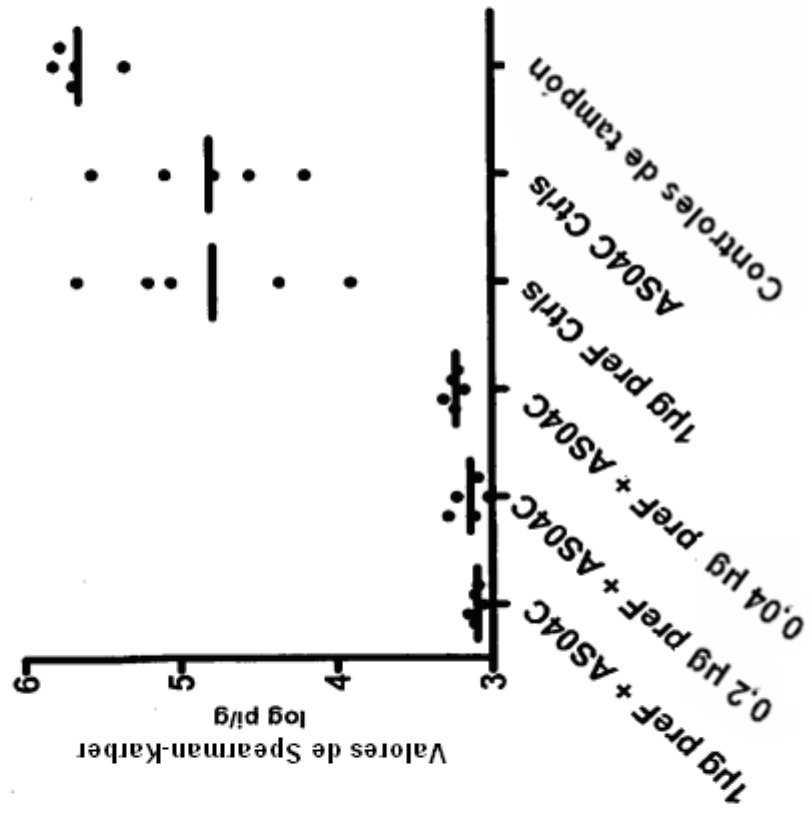


FIG. 6B

Protección de CHO-PreF frente a estimulación



**FIG. 7**  
Reclutamiento de eosinófilos pulmonares después de estimulación en ratones

