



No. 11-181053-00000-0000

Fecha: 2011-12-29 16:46:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Trb. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACIÓN Folios: 172



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTÍGENOS DE VIRUS DE SINCICIO RESPIRATORIO
RECOMBINANTES

SOLICITANTE: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.; ID BIOMEDICAL
CORPORATION OF QUEBEC

DIRECCIÓN: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica ; 525 Cartier
Boulevard West, Laval, Quebec H7V 3S8 Canada.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 29 de Diciembre de 2011

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-181053- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 16:46:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 172

PETITORIO - FORMULARIO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000221

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

and ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC

Dirección: Rue de l'Institut 89 B-1330

Rixensart, Bélgica.; 525 cartier boulevard west.

laval, quebec h7v 3s8 Canada.

Nacionalidad o Domicilio: Belga ; Canadá

Lugar de Constitución: Bélgica ; Canadá

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE.

Dirección: Carrera 5 No. 34-03, Bogotá

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/059008 Fecha Junio 24, 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/149745 Fecha Diciembre 29, 2010

6

Título (54) ANTÍGENOS DE VIRUS DE SINCICIO RESPIRATORIO RECOMBINANTES.

Clasificación Internacional (51) A61K 39/155, C07K 14/135.

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

Junio 24, 2009

61/219,964

US

Mayo 27, 2010

61/334,568

9

Comprobante de pago No. 11-

Fecha Diciembre de 2011



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 11-092.213.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



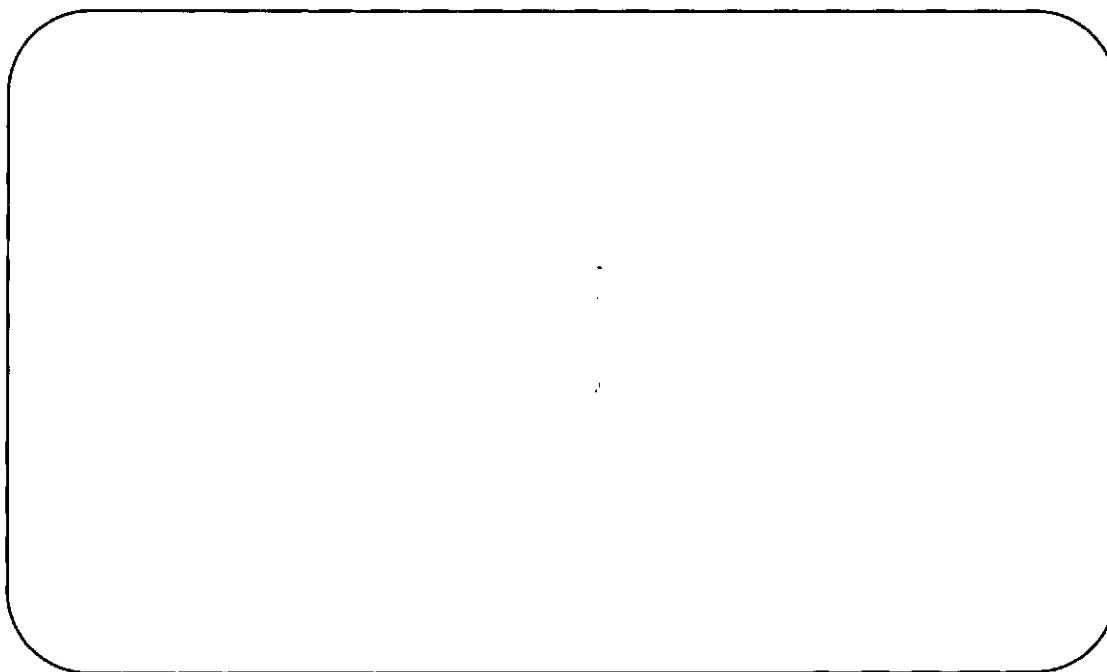
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

2

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2010/059008

Guy Jean Marie Fernand Pierre BAUDOUX

GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
rue de l'Institut 89
B-1330 Rixensart
Belgica
Nacionalidad: Belga

Normand BLAIS

GlaxoSmithKline Biologicals Laval,
525 Cartier Boulevard West, Laval,
Quebec H7V 3S8
Canadá
Nacionalidad: Canadiense

Sonya L CYR

GlaxoSmithKline Biologicals Laval,
525 Cartier Boulevard West, Laval,
Quebec H7V 3S8
Canadá
Nacionalidad: Canadiense

Patrick RHEAULT

GlaxoSmithKline Biologicals Laval,
525 Cartier Boulevard West, Laval,
Quebec H7V 3S8
Canadá
Nacionalidad: Canadiense

Jean Louis RUELLÉ

GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
rue de l'Institut 89
B-1330 Rixensart
Belgica
Nacionalidad: Belga

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 126952
		Bogotá D.C., Diciembre 29 de 2011 - 10:45:33

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS	NI 830.122.870
--	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	409132802	28/12/2011	6.677.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00 571.000.00
			\$571.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-181053- -00000-0000
Fecha: 2011-12-29 16:46:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 172

4

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés
presentado ante mí.
ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Ministerio de Justicia
Licencia 0041/1996

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por **DEBORAH A. BECKER**
3. actuando en calidad de **NOTARIO PÚBLICO**
4. lleva el sello del **DEBORAH A BECKER, NOTARIO PÚBLICO, CONDADO DE MONTGOMERY, ESTADO DE PENNSYLVANIA**

CERTIFICA

5. en Harrisburg, Pennsylvania
6. el 20 de mayo de 2011
7. por Carol Aichele, Secretario encargado para el Estado de Pennsylvania
8. No. 201117301
9. Sello: (ilegible)
10. Firma: (ilegible)
Carol Aichele

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
Jefe de Legaciones
BOGOTÁ D.C.
2011 JUN 23 A 7 58
0117332
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
Cada firma aparece en el
documento de manera
conforme a las
funciones indicadas

Esta Apostilla solamente certifica la autenticidad de la rúbrica y el cargo de la persona
quien firmó este documento público, y, cuando fuera el caso, la identidad del sello que lleve
el documento público.

Esta Apostilla no certifica el contenido del documento.

Esta Apostilla no tiene validez dentro de los Estados Unidos de América, sus territorios o
posesiones.

Certificación Notarial

NOTARIO PÚBLICO (Firma): ilegible

Sello: ESTADO DE PENNSYLVANIA

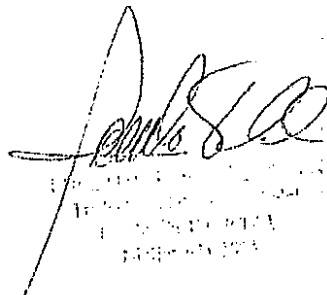
Sello Notarial

Deborah A. Becker, Notario Público

Upper Merion Twp., Condado de Montgomery

Mi comisión vence el 6 de abril de 2012

Miembro de la Asociación de Notario Públicos de Pennsylvania



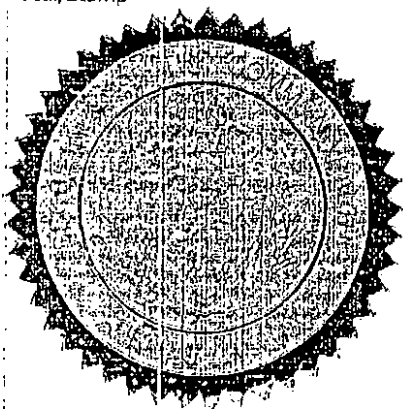
The image shows a handwritten signature, likely of Deborah A. Becker, written in dark ink. The signature is stylized and overlaps with a circular notary seal. The seal contains text that is partially obscured by the signature but appears to include the words "NOTARY PUBLIC" and "PENNSYLVANIA". The signature is written in a cursive style.

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : United States of America
2. This public document has been signed by DEBORAH A BECKER
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp DEBORAH A BECKER , NOTARY PUBLIC, MONTGOMERY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Certified

5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 20th day of May, 2011
7. by Carol Aichele, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No: 201117301
9. Seal/Stamp
10. Signature



Carol Aichele

Carol Aichele

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the capacity of the person who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears.

This Apostille does not certify the content of the document for which it was issued.

This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions.

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

Rue de l'Institute 89, B-1330 Rixensart, Bélgica

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right, also to file Unfair competition actions and request injunctions in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtenedor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual y también para presentar acciones de competencia desleal y pedir medidas cautelares a nombre de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:



Date/Fecha: 19 May Two thousand eleven

City/Country/Ciudad, País: King of Prussia, Pennsylvania, USA

Diagonal 34 No. 5 - 28 Bogotá D.C., Colombia.

Tel: + 57 (1) 601-7700 Fax: + 57 (1) 601-7700 e-mail: office@olartemoure.com

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
19 May 2011

The undersigned Notary Public certifies:

1. That Edward R. Gimmi

COMPLETE NAME OF OFFICER SIGNING PoA
of legal age and domiciled in King of Prussia,
Pennsylvania, USA

OFFICER'S FULL STREET ADDRESS
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Authorized Official and Attorney
of GlaxoSmithKline Biologicals s.a..

3. That GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
S.A.
having its principal place of business located in
Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Power of Attorney dated 26 May 2008

NOTARY PUBLIC (Signature):

Deborah A. Becker

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

COMPLETE NAME OF OFFICER SIGNING PoA
mayor de edad y domiciliado

OFFICER'S FULL STREET ADDRESS
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

3. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas
en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del)
siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Notarial Seal
Deborah A. Becker, Notary Public
Upper Merion Twp., Montgomery County
My Commission Expires April 6, 2012
Member, Pennsylvania Association of Notaries

MODEL OF CONSULAR CERTIFICATION

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 December 2010 (29.12.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/149745 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/155 (2006.01) *C07K 14/135* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/059008

(22) International Filing Date:
24 June 2010 (24.06.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/219,964 24 June 2009 (24.06.2009) US
61/334,568 13 May 2010 (13.05.2010) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC** [CA/CA]; 525 Cartier Boulevard West, Laval, Quebec H7V 3S8 (CA).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAUDOUX, Guy Jean Marie Fernand Pierre** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **BLAIS, Normand** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Laval, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Quebec H7V 3S8 (CA). **CYR, Sonya L** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Laval, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Quebec H7V 3S8 (CA). **RHEAULT, Patrick** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Laval, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Quebec H7V 3S8 (CA). **RUELLE, Jean Louis** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agents: **DALTON, Marcus Jonathan William et al.**; GlaxoSmithKline, Global Patents CN925.1, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AI, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: RECOMBINANT RSV ANTIGENS

(57) Abstract: This disclosure provides recombinant respiratory syncytial virus (RSV) antigens and methods for making and using them, including immunogenic compositions (e.g., vaccines) for the treatment and/or prevention of RSV infection.

WO 2010/149745 A1

78

RECOMBINANT RSV ANTIGENS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[001] This application claims benefit of the earlier filing dates of United States Provisional Applications 61/334,568, filed 13 May 2010 and 61/219,964, filed 24 June 2009, the disclosures of which are incorporated herein by reference.

COPYRIGHT NOTIFICATION PURSUANT TO 37 C.F.R. § 1.71(E)

[002] A portion of the disclosure of this patent document contains material which is subject to copyright protection. The copyright owner has no objection to the facsimile reproduction by anyone of the patent document or the patent disclosure, as it appears in the Patent and Trademark Office patent file or records, but otherwise reserves all copyright rights whatsoever.

BACKGROUND

[003] This disclosure concerns the field of immunology. More particularly this disclosure relates to compositions and methods for eliciting an immune response specific for Respiratory Syncytial Virus (RSV).

[004] Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the most common worldwide cause of lower respiratory tract infections (LRI) in infants less than 6 months of age and premature babies less than or equal to 35 weeks of gestation. The RSV disease spectrum includes a wide array of respiratory symptoms from rhinitis and otitis to pneumonia and bronchiolitis, the latter two diseases being associated with considerable morbidity and mortality. Humans are the only known reservoir for RSV. Spread of the virus from contaminated nasal secretions occurs via large respiratory droplets, so close contact with an infected individual or contaminated surface is required for transmission. RSV can persist for several hours on toys or other objects, which explains the high rate of nosocomial RSV infections, particularly in paediatric wards.

[005] The global annual infection and mortality figures for RSV are estimated to be 64 million and 160,000 respectively. In the U.S. alone RSV is estimated to be responsible for

18,000 to 75,000 hospitalizations and 90 to 1900 deaths annually. In temperate climates, RSV is well documented as a cause of yearly winter epidemics of acute LRI, including bronchiolitis and pneumonia. In the USA, nearly all children have been infected with RSV by two years of age. The incidence rate of RSV-associated LRI in otherwise healthy children was calculated as 37 per 1000 child-year in the first two years of life (45 per 1000 child-year in infants less than 6 months old) and the risk of hospitalization as 6 per 1000 child-years (per 1000 child-years in the first six months of life). Incidence is higher in children with cardio-pulmonary disease and in those born prematurely, who constitute almost half of RSV-related hospital admissions in the USA. Children who experience a more severe LRI caused by RSV later have an increased incidence of childhood asthma. These studies demonstrate widespread need for RSV vaccines, as well as use thereof, in industrialized countries, where the costs of caring for patients with severe LRI and their sequelae are substantial. RSV also is increasingly recognized as an important cause of morbidity from influenza-like illness in the elderly.

[006] Various approaches have been attempted in efforts to produce a safe and effective RSV vaccine that produces durable and protective immune responses in healthy and at risk populations. However, none of the candidates evaluated to date have been proven safe and effective as a vaccine for the purpose of preventing RSV infection and/or reducing or preventing RSV disease, including lower respiratory infections (LRIs).

SUMMARY

[007] This disclosure concerns recombinant respiratory syncytial virus (RSV) antigens. More specifically, this disclosure concerns antigens including a recombinant F protein that has been modified to stabilize the trimeric prefusion conformation. The disclosed recombinant antigens exhibit superior immunogenicity, and are particularly favorably employed as components of immunogenic compositions (e.g., vaccines) for protection against RSV infection and/or disease. Also disclosed are nucleic acids that encode the recombinant antigens, immunogenic compositions containing the antigens, and methods for producing and using the antigens.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[008] FIG. 1A is a schematic illustration highlighting structural features of the RSV F protein. FIG. 1B is a schematic illustration of exemplary RSV Prefusion F (PreF) antigens.

[009] FIG. 2 is a line graph illustrating representative results of asymmetrical field flow fractionation (AFF-MALS) analysis of PreF.

[010] FIG. 3 is a bar graph showing neutralization inhibition of human serum by PreF antigen.

[011] FIGS. 4A and B are bar graphs showing serum IgG titers elicited in mice in response to PreF antigen.

[012] FIGS. 5A and B are bar graphs illustrating titers of neutralizing antibodies specific for RSV elicited by PreF antigen.

[013] FIGS. 6A and B are graphs indicating protection against challenge provided by the RSV PreF antigen in mice.

[014] FIG. 7 is a graph evaluating BAL leukocytes following immunization and challenge.

[015] FIG. 8 is a bar graph illustrating serum IgG elicited following immunization with PreF formulated with dilutions of an oil-in-water emulsion (AS03).

[016] FIG. 9 is a bar graph illustrating neutralizing antibody titres following immunization with PreF formulated with dilutions of an oil-in-water emulsion (AS03)

[017] FIG. 10 is a graph illustrating protection against challenge following immunization with PreF formulated with dilutions of an oil-in-water emulsion (AS03).

DETAILED DESCRIPTION

INTRODUCTION

[018] Development of vaccines to prevent RSV infection has been complicated by the fact that host immune responses appear to play a role in the pathogenesis of the disease. Early studies in the 1960s showed that children vaccinated with a formalin-inactivated RSV vaccine suffered from more severe disease on subsequent exposure to the virus as compared to unvaccinated control subjects. These early trials resulted in the hospitalization of 80% of vaccinees and two deaths. The enhanced severity of disease has been reproduced in animal models and is thought to result from inadequate levels of serum-neutralizing antibodies, lack of local immunity, and excessive induction of a type 2

helper T-cell-like (Th2) immune response with pulmonary eosinophilia and increased production of IL-4 and IL-5 cytokines. In contrast, a successful vaccine that protects against RSV infection induces a Th1 biased immune response, characterized by production of IL-2 and γ -interferon (IFN).

[019] The present disclosure concerns recombinant respiratory syncytial virus (RSV) antigens that solve problems encountered with RSV antigens previously used in vaccines, and improve the immunological as well as manufacturing properties of the antigen. The recombinant RSV antigens disclosed herein involve a Fusion (F) protein analog that include a soluble F protein polypeptide, which has been modified to stabilize the prefusion conformation of the F protein, that is, the conformation of the mature assembled F protein prior to fusion with the host cell membrane. These F protein analogs are designated "PreF" or "PreF antigens", for purpose of clarity and simplicity. The PreF antigens disclosed herein are predicated on the unforeseen discovery that soluble F protein analogs that have been modified by the incorporation of a heterologous trimerization domain exhibit improved immunogenic characteristics, and are safe and highly protective when administered to a subject *in vivo*.

[020] Details of the structure of the RSV F protein are provided herein with reference to terminology and designations widely accepted in the art, and illustrated schematically in FIG. 1A. A schematic illustration of exemplary PreF antigens is provided in FIG. 1B. It will be understood by those of skill in the art that any RSV F protein can be modified to stabilize the prefusion conformation according to the teachings provided herein. Therefore, to facilitate understanding of the principles guiding production of PreF antigens, individual structural components will be indicated with reference to an exemplary F protein, the polynucleotide and amino acid sequence of which are provided in SEQ ID NOs:1 and 2, respectively. Similarly, where applicable, G protein antigens are described in reference to an exemplary G protein, the polynucleotide and amino acid sequences of which are provided in SEQ ID NOs:3 and 4, respectively.

[021] With reference to the primary amino acid sequence of the F protein polypeptide (FIG. 1A), the following terms are utilized to describe structural features of the PreF antigens.

[022] The term F0 refers to a full-length translated F protein precursor. The F0 polypeptide can be subdivided into an F2 domain and an F1 domain separated by an intervening peptide, designated pep27. During maturation, the F0 polypeptide undergoes proteolytic cleavage at two furin sites situated between F2 and F1 and flanking pep27. For purpose of the ensuing discussion, an F2 domain includes at least a portion, and as much as all, of amino acids 1-109, and a soluble portion of an F1 domain includes at least a portion, and up to all, of amino acids 137-526 of the F protein. As indicated above, these amino acid positions (and all subsequent amino acid positions designated herein) are given in reference to the exemplary F protein precursor polypeptide (F0) of SEQ ID NO:2.

[023] The prefusion F (or "PreF") antigen is a soluble (that is, not membrane bound) F protein analog that includes at least one modification that stabilizes the prefusion conformation of the F protein, such that the RSV antigen retains at least one immunodominant epitope of the prefusion conformation of the F protein. The soluble F protein polypeptide includes an F2 domain and an F1 domain of the RSV F protein (but does not include a transmembrane domain of the RSV F protein). In exemplary embodiments, the F2 domain includes amino acids 26-105 and the F1 domain includes amino acids 137-516 of an F protein. However, smaller portions can also be used, so long as the three-dimensional conformation of the stabilized PreF antigen is maintained. Similarly, polypeptides that include additional structural components (*e.g.*, fusion polypeptides) can also be used in place of the exemplary F2 and F1 domains, so long as the additional components do not disrupt the three-dimensional conformation, or otherwise adversely impact stability, production or processing, or decrease immunogenicity of the antigen. The F2 and F1 domains are positioned in an N-terminal to C-terminal orientation designed to replicate folding and assembly of the F protein analog into the mature prefusion conformation. To enhance production, the F2 domain can be preceded by a secretory signal peptide, such as a native F protein signal peptide or a heterologous signal peptide chosen to enhance production and secretion in the host cells in which the recombinant PreF antigen is to be expressed.

[024] The PreF antigens are stabilized (in the trimeric prefusion conformation) by introducing one or more modifications, such as the addition, deletion or substitution, or one or more amino acids. One such stabilizing modification is the addition of an amino acid sequence comprising a heterologous stabilizing domain. In exemplary embodiments,

the heterologous stabilizing domain is a protein multimerization domain. One particularly favorable example of such a protein multimerization domain is a coiled-coil domain, such as an isoleucine zipper domain that promotes trimerization of multiple polypeptides having such a domain. An exemplary isoleucine zipper domain is depicted in SEQ ID NO:11. Typically, the heterologous stabilizing domain is positioned C-terminal to the F1 domain.

[025] Optionally, the multimerization domain is connected to the F1 domain via a short amino acid linker sequence, such as the sequence GG. The linker can also be a longer linker (for example, including the sequence GG, such as the amino acid sequence: GGSGGSGGS; SEQ ID NO:14). Numerous conformationally neutral linkers are known in the art that can be used in this context without disrupting the conformation of the PreF antigen.

[026] Another stabilizing modification is the elimination of a furin recognition and cleavage site that is located between the F2 and F1 domains in the native F0 protein. One or both furin recognition sites, located at positions 105-109 and at positions 133-136 can be eliminated by deleting or substituting one or more amino acid of the furin recognition sites, such that the protease is incapable of cleaving the PreF polypeptide into its constituent domains. Optionally, the intervening pep27 peptide can also be removed or substituted, *e.g.*, by a linker peptide. Additionally, or optionally, a non-furin cleavage site (*e.g.*, a metalloproteinase site at positions 112-113) in proximity to the fusion peptide can be removed or substituted.

[027] Another example of a stabilizing mutation is the addition or substitution of a hydrophilic amino acid into a hydrophobic domain of the F protein. Typically, a charged amino acid, such as lysine, will be added or substituted for a neutral residue, such as leucine, in the hydrophobic region. For example, a hydrophilic amino acid can be added to, or substituted for, a hydrophobic or neutral amino acid within the HRB coiled-coil domain of the F protein extracellular domain. By way of example, a charged amino acid residue, such as lysine, can be substituted for the leucine present at position 512 of the F protein. Alternatively, or in addition, a hydrophilic amino acid can be added to, or substituted for, a hydrophobic or neutral amino acid within the HRA domain of the F protein. For example, one or more charged amino acids, such as lysine, can be inserted at or near position 105-106 (*e.g.*, following the amino acid corresponding to residue 105 of

M

reference SEQ ID NO:2, such as between amino acids 105 and 106) of the PreF antigen). Optionally, hydrophilic amino acids can be added or substituted in both the HRA and HRB domains. Alternatively, one or more hydrophobic residues can be deleted, so long as the overall conformation of the PreF antigen is not adversely impacted.

[028] Additionally or alternatively, one or more modification may be made, which alters the glycosylation state of the PreF antigen. For example, one or more amino acids in a glycosylation site present in a native RSV F protein, *e.g.*, at or around amino acid residue 500 (as compared to SEQ ID NO:2) can be deleted or substituted (or an amino acid can be added such that the glycosylation site is disrupted) to increase or decrease the glycosylation status of the PreF antigen. For example, the amino acids corresponding to positions 500-502 of SEQ ID NO:2 can be selected from: NGS; NKS; NGT; and NKT. Thus, in certain embodiments, the PreF antigens include a soluble F protein polypeptide comprising an F2 domain (*e.g.*, corresponding to amino acids 26-105 of SEQ ID NO:2) and an F1 domain (*e.g.*, corresponding to amino acids 137-516 of SEQ ID NO:2) of an RSV F protein polypeptide, in which at least one modification that alters glycosylation has been introduced. The RSV PreF antigen, typically includes an intact fusion peptide between the F2 domain and the F1 domain. Optionally, the PreF antigen includes a signal peptide.

[029] As disclosed above, such F protein polypeptides can include at least one modification selected from: (i) an addition of an amino acid sequence comprising a heterologous trimerization domain (such as a isoleucine zipper domain); (ii) a deletion of at least one furin cleavage site; (iii) a deletion of at least one non-furin cleavage site; (iv) a deletion of one or more amino acids of the pep27 domain; and (v) at least one substitution or addition of a hydrophilic amino acid in a hydrophobic domain of the F protein extracellular domain. As disclosed above, such glycosylation modified RSV PreF antigens assemble into multimers, *e.g.*, trimers.

[030] In exemplary embodiments, the glycosylation modified PreF antigens are selected from the group of: a) a polypeptide comprising or consisting of SEQ ID NO:22; b) a polypeptide encoded by SEQ ID NO:21 or by a polynucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions over substantially its entire length to SEQ ID NO:21; c) a polypeptide with at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:22.

[031] Any and/or all of the stabilizing modifications can be used individually and/or in combination with any of the other stabilizing modifications disclosed herein to produce a PreF antigen. In exemplary embodiments the PreF protein comprising a polypeptide comprising an F2 domain and an F1 domain with no intervening furin cleavage site between the F2 domain and the F1 domain, and with a heterologous stabilizing domain (*e.g.*, trimerization domain) positioned C-terminal to the F1 domain. In certain embodiments, the PreF antigen also includes one or more addition and/or substitution of a hydrophilic residue into a hydrophobic HRA and/or HRB domain. Optionally, the PreF antigen has a modification of at least one non-furin cleavage site, such as a metalloproteinase site.

[032] A PreF antigen can optionally include an additional polypeptide component that includes at least an immunogenic portion of the RSV G protein. That is, in certain embodiments, the PreF antigen is a chimeric protein that includes both an F protein and a G protein component. The F protein component can be any of the PreF antigens described above, and the G protein component is selected to be an immunologically active portion of the RSV G protein (up to and/or including a full-length G protein). In exemplary embodiments, the G protein polypeptide includes amino acids 149-229 of a G protein (where the amino acid positions are designated with reference to the G protein sequence represented in SEQ ID NO:4). One of skill in the art will appreciate that a smaller portion or fragment of the G protein can be used, so long as the selected portion retains the dominant immunologic features of the larger G protein fragment. In particular, the selected fragment retains the immunologically dominant epitope between about amino acid positions 184-198 (*e.g.*, amino acids 180-200), and be sufficiently long to fold and assemble into a stable conformation that exhibits the immunodominant epitope. Longer fragments can also be used, *e.g.*, from about amino acid 128 to about amino acid 229, up to the full-length G protein. So long as the selected fragment folds into a stable conformation in the context of the chimeric protein, and does not interfere with production, processing or stability when produced recombinantly in host cells. Optionally, the G protein component is connected to the F protein component via a short amino acid linker sequence, such as the sequence GG. The linker can also be a longer linker (such as the amino acid sequence: GGS GGS GGS: SEQ ID NO:14). Numerous conformationally neutral linkers are known in the art that can be used in this context without disrupting the conformation of the PreF antigen.

[033] Optionally, the G protein component can include one or more amino acid substitutions that reduce or prevent enhanced viral disease in an animal model of RSV disease. That is, the G protein can include an amino acid substitution, such that when an immunogenic composition including the PreF-G chimeric antigen is administered to a subject selected from an accepted animal model (*e.g.*, mouse model of RSV), the subject exhibits reduced or no symptoms of vaccine enhanced viral disease (*e.g.*, eosinophilia, neutrophilia), as compared to a control animal receiving a vaccine including that contains an unmodified G protein. The reduction and/or prevention of vaccine enhanced viral disease can be apparent when the immunogenic compositions are administered in the absence of adjuvant (but not, for example, when the antigens are administered in the presence of a strong Th1 inducing adjuvant). Additionally, the amino acid substitution can reduce or prevent vaccine enhanced viral disease when administered to a human subject. An example of a suitable amino acid substitution is the replacement of asparagine at position 191 by an alanine (Asn → Ala at amino acid 191: N191A).

[034] Optionally, any PreF antigen described above can include an additional sequence that serves as an aid to purification. One example, is a polyhistidine tag. Such a tag can be removed from the final product if desired.

[035] When expressed, the PreF antigens undergo intramolecular folding and assemble into mature protein that includes a multimer of polypeptides. Favorably, the preF antigen polypeptides assemble into a trimer that resembles the prefusion conformation of the mature, processed, RSV F protein.

[036] Any of the PreF antigens (including PreF-G antigens) disclosed herein can be favorably used in immunogenic compositions for the purpose of eliciting a protective immune response against RSV. Such immunogenic compositions typically include a pharmaceutically acceptable carrier and/or excipient, such as a buffer. To enhance the immune response produced following administration, the immunogenic composition typically also includes an adjuvant. In the case of immunogenic compositions for eliciting a protective immune response against RSV (*e.g.*, vaccines), the compositions favorably include an adjuvant that predominantly elicits a Th1 immune response (a Th1 biasing adjuvant). Typically, the adjuvant is selected to be suitable for administration to the target population to which the composition is to be administered. Thus, depending on the

application, the adjuvant is selected to be suitable for administration, *e.g.*, to neonates or to the elderly.

[037] The immunogenic compositions described herein are favorably employed as vaccines for the reduction or prevention of infection with RSV, without inducing a pathological response (such as vaccine enhanced viral disease) following administration or exposure to RSV.

[038] In some embodiments, the immunogenic composition includes a PreF antigen (such as the exemplary embodiment illustrated by SEQ ID NO:6) and a second polypeptide that includes a G protein component. The G protein component typically includes at least amino acids 149-229 of a G protein. Although smaller portions of the G protein can be used, such fragments should include, at a minimum, the immunological dominant epitope of amino acids 184-198. Alternatively, the G protein can include a larger portion of the G protein, such as amino acids 128-229 or 130-230, optionally as an element of a larger protein, such as a full-length G protein, or a chimeric polypeptide.

[039] In other embodiments, the immunogenic composition includes a PreF antigen that is a chimeric protein that also includes a G protein component (such as the exemplary embodiments illustrated by SEQ ID NOs:8 and 10). The G protein component of such a chimeric PreF (or PreF-G) antigen typically includes at least amino acids 149-229 of a G protein. As indicated above, smaller or larger fragments (such as amino acids 129-229 or 130-230) of the G protein can also be used, so long as the immunodominant epitopes are retained, and conformation of the PreF-G antigen is not adversely impacted.

[040] Optionally, the immunogenic compositions can also include at least one additional antigen of a pathogenic organism other than RSV. For example, the pathogenic organism is a virus other than RSV, such as Parainfluenza virus (PIV), measles, hepatitis B, poliovirus, or influenza virus. Alternatively, the pathogenic organism can be a bacterium, such as diphtheria, tetanus, pertussis, *Haemophilus influenzae*, and *Pneumococcus*.

[041] Recombinant nucleic acids that encode any of the PreF antigens (including PreF-G antigens) are also a feature of this disclosure. In some embodiments, the polynucleotide sequence of the nucleic acid that encodes the PreF antigen of the nucleic acid is optimized for expression in a selected host (such as CHO cells, other mammalian cells, or insect cells). Accordingly, vectors, including expression vectors (including prokaryotic and

eukaryotic expression vectors) are a feature of this disclosure. Likewise, host cells including such nucleic acids, and vectors, are a feature of this disclosure. Such nucleic acids can also be used in the context of immunogenic compositions for administration to a subject to elicit an immune response specific for RSV.

[042] The PreF antigens are favorably used for the prevention and/or treatment of RSV infection. Thus, another aspect of this disclosure concerns a method for eliciting an immune response against RSV. The method involves administering an immunologically effective amount of a composition containing a PreF antigen to a subject (such as a human or animal subject). Administration of an immunologically effective amount of the composition elicits an immune response specific for epitopes present on the PreF antigen. Such an immune response can include B cell responses (e.g., the production of neutralizing antibodies) and/or T cell responses (e.g., the production of cytokines). Favorably, the immune response elicited by the PreF antigen includes elements that are specific for at least one conformational epitope present on the prefusion conformation of the RSV F protein. The PreF antigens and compositions can be administered to a subject without enhancing viral disease following contact with RSV. Favorably, the PreF antigens disclosed herein and suitably formulated immunogenic compositions elicit a Th1 biased immune response that reduces or prevents infection with a RSV and/or reduces or prevents a pathological response following infection with a RSV.

[043] The immunogenic compositions can be administered via a variety of routes, including routes, such as intranasal, that directly place the PreF antigen in contact with the mucosa of the upper respiratory tract. Alternatively, more traditional administration routes can be employed, such as an intramuscular route of administration.

[044] Thus, the use of any of the disclosed RSV antigens (or nucleic acids) in the preparation of a medicament for treating RSV infection (for example, prophylactically treating or preventing an RSV infection) is also contemplated. Accordingly, this disclosure provides the disclosed recombinant RSV antigens or the immunogenic compositions for use in medicine, as well as the use thereof for the prevention or treatment of RSV-associated diseases.

[045] Additional details regarding PreF antigens, and methods of using them, are presented in the description and examples below.

TERMS

[046] In order to facilitate review of the various embodiments of this disclosure, the following explanations of terms are provided. Additional terms and explanations can be provided in the context of this disclosure.

[047] Unless otherwise explained, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this disclosure belongs. Definitions of common terms in molecular biology can be found in Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[048] The singular terms "a," "an," and "the" include plural referents unless context clearly indicates otherwise. Similarly, the word "or" is intended to include "and" unless the context clearly indicates otherwise. The term "plurality" refers to two or more. It is further to be understood that all base sizes or amino acid sizes, and all molecular weight or molecular mass values, given for nucleic acids or polypeptides are approximate, and are provided for description. Additionally, numerical limitations given with respect to concentrations or levels of a substance, such as an antigen, are intended to be approximate. Thus, where a concentration is indicated to be at least (for example) 200 pg, it is intended that the concentration be understood to be at least approximately (or "about" or "~") 200 pg.

[049] Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of this disclosure, suitable methods and materials are described below. The term "comprises" means "includes." Thus, unless the context requires otherwise, the word "comprises," and variations such as "comprise" and "comprising" will be understood to imply the inclusion of a stated compound or composition (*e.g.*, nucleic acid, polypeptide, antigen) or step, or group of compounds or steps, but not to the exclusion of any other compounds, composition, steps, or groups thereof. The abbreviation, "*e.g.*" is derived from the Latin *exempli gratia*, and is used herein to indicate a non-limiting example. Thus, the abbreviation "*e.g.*" is synonymous with the term "for example."

12

[050] Respiratory syncytial virus (RSV) is a pathogenic virus of the family Paramyxoviridae, subfamily Pneumovirinae, genus Pneumovirus. The genome of RSV is a negative-sense RNA molecule, which encodes 11 proteins. Tight association of the RNA genome with the viral N protein forms a nucleocapsid wrapped inside the viral envelope. Two groups of human RSV strains have been described, the A and B groups, based on differences in the antigenicity of the G glycoprotein. Numerous strains of RSV have been isolated to date. Exemplary strains indicated by GenBank and/or EMBL Accession number can be found in WO2008114149, which is incorporated herein by reference for the purpose of disclosing the nucleic acid and polypeptide sequences of RSV F and G proteins suitable for use in PreF antigens (including chimeric PreF-G antigens), and in combinations with PreF antigens. Additional strains of RSV are likely to be isolated, and are encompassed within the genus of RSV. Similarly, the genus of RSV encompasses variants arising from naturally occurring (*e.g.*, previously or subsequently identified strains) by genetic drift, or artificial synthesis and/or recombination.

[051] The term “F protein” or “Fusion protein” or “F protein polypeptide” or Fusion protein polypeptide” refers to a polypeptide or protein having all or part of an amino acid sequence of an RSV Fusion protein polypeptide. Similarly, the term “G protein” or “G protein polypeptide” refers to a polypeptide or protein having all or part of an amino acid sequence of an RSV Attachment protein polypeptide. Numerous RSV Fusion and Attachment proteins have been described and are known to those of skill in the art. WO2008114149 sets out exemplary F and G protein variants (for example, naturally occurring variants) publicly available as of the filing date of this disclosure.

[052] A “variant” when referring to a nucleic acid or a polypeptide (*e.g.*, an RSV F or G protein nucleic acid or polypeptide, or a PreF nucleic acid or polypeptide) is a nucleic acid or a polypeptide that differs from a reference nucleic acid or polypeptide. Usually, the difference(s) between the variant and the reference nucleic acid or polypeptide constitute a proportionally small number of differences as compared to the referent.

[053] A “domain” of a polypeptide or protein is a structurally defined element within the polypeptide or protein. For example, a “trimerization domain” is an amino acid sequence within a polypeptide that promotes assembly of the polypeptide into trimers. For example, a trimerization domain can promote assembly into trimers via associations with other trimerization domains (of additional polypeptides with the same or a different amino acid

sequence). The term is also used to refer to a polynucleotide that encodes such a peptide or polypeptide.

[054] The terms “native” and “naturally occurring” refer to an element, such as a protein, polypeptide or nucleic acid, that is present in the same state as it is in nature. That is, the element has not been modified artificially. It will be understood, that in the context of this disclosure, there are numerous native/naturally occurring variants of RSV proteins or polypeptides, *e.g.*, obtained from different naturally occurring strains or isolates of RSV.

[055] The term “polypeptide” refers to a polymer in which the monomers are amino acid residues which are joined together through amide bonds. The terms “polypeptide” or “protein” as used herein are intended to encompass any amino acid sequence and include modified sequences such as glycoproteins. The term “polypeptide” is specifically intended to cover naturally occurring proteins, as well as those which are recombinantly or synthetically produced. The term “fragment,” in reference to a polypeptide, refers to a portion (that is, a subsequence) of a polypeptide. The term “immunogenic fragment” refers to all fragments of a polypeptide that retain at least one predominant immunogenic epitope of the full-length reference protein or polypeptide. Orientation within a polypeptide is generally recited in an N-terminal to C-terminal direction, defined by the orientation of the amino and carboxy moieties of individual amino acids. Polypeptides are translated from the N or amino-terminus towards the C or carboxy-terminus.

[056] A “signal peptide” is a short amino acid sequence (*e.g.*, approximately 18-25 amino acids in length) that direct newly synthesized secretory or membrane proteins to and through membranes, *e.g.*, of the endoplasmic reticulum. Signal peptides are frequently but not universally located at the N-terminus of a polypeptide, and are frequently cleaved off by signal peptidases after the protein has crossed the membrane. Signal sequences typically contain three common structural features: an N-terminal polar basic region (n-region), a hydrophobic core, and a hydrophilic c-region).

[057] The terms “polynucleotide” and “nucleic acid sequence” refer to a polymeric form of nucleotides at least 10 bases in length. Nucleotides can be ribonucleotides, deoxyribonucleotides, or modified forms of either nucleotide. The term includes single and double forms of DNA. By “isolated polynucleotide” is meant a polynucleotide that is not immediately contiguous with both of the coding sequences with which it is

immediately contiguous (one on the 5' end and one on the 3' end) in the naturally occurring genome of the organism from which it is derived. In one embodiment, a polynucleotide encodes a polypeptide. The 5' and 3' direction of a nucleic acid is defined by reference to the connectivity of individual nucleotide units, and designated in accordance with the carbon positions of the deoxyribose (or ribose) sugar ring. The informational (coding) content of a polynucleotide sequence is read in a 5' to 3' direction.

[058] A "recombinant" nucleic acid is one that has a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence. This artificial combination can be accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, *e.g.*, by genetic engineering techniques. A "recombinant" protein is one that is encoded by a heterologous (*e.g.*, recombinant) nucleic acid, which has been introduced into a host cell, such as a bacterial or eukaryotic cell. The nucleic acid can be introduced, on an expression vector having signals capable of expressing the protein encoded by the introduced nucleic acid or the nucleic acid can be integrated into the host cell chromosome.

[059] The term "heterologous" with respect to a nucleic acid, a polypeptide or another cellular component, indicates that the component occurs where it is not normally found in nature and/or that it originates from a different source or species.

[060] The term "purification" (*e.g.*, with respect to a pathogen or a composition containing a pathogen) refers to the process of removing components from a composition, the presence of which is not desired. Purification is a relative term, and does not require that all traces of the undesirable component be removed from the composition. In the context of vaccine production, purification includes such processes as centrifugation, dialization, ion-exchange chromatography, and size-exclusion chromatography, affinity-purification or precipitation. Thus, the term "purified" does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative term. Thus, for example, a purified nucleic acid preparation is one in which the specified protein is more enriched than the nucleic acid is in its generative environment, for instance within a cell or in a biochemical reaction chamber. A preparation of substantially pure nucleic acid or protein can be purified such that the desired nucleic acid represents at least 50% of the total nucleic acid content of the preparation. In certain embodiments, a substantially pure nucleic acid will represent at

least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% or more of the total nucleic acid or protein content of the preparation.

[061] An “isolated” biological component (such as a nucleic acid molecule, protein or organelle) has been substantially separated or purified away from other biological components in the cell of the organism in which the component naturally occurs, such as, other chromosomal and extra-chromosomal DNA and RNA, proteins and organelles. Nucleic acids and proteins that have been “isolated” include nucleic acids and proteins purified by standard purification methods. The term also embraces nucleic acids and proteins prepared by recombinant expression in a host cell as well as chemically synthesized nucleic acids and proteins.

[062] An “antigen” is a compound, composition, or substance that can stimulate the production of antibodies and/or a T cell response in an animal, including compositions that are injected, absorbed or otherwise introduced into an animal. The term “antigen” includes all related antigenic epitopes. The term “epitope” or “antigenic determinant” refers to a site on an antigen to which B and/or T cells respond. The “dominant antigenic epitopes” or “dominant epitope” are those epitopes to which a functionally significant host immune response, *e.g.*, an antibody response or a T-cell response, is made. Thus, with respect to a protective immune response against a pathogen, the dominant antigenic epitopes are those antigenic moieties that when recognized by the host immune system result in protection from disease caused by the pathogen. The term “T-cell epitope” refers to an epitope that when bound to an appropriate MHC molecule is specifically bound by a T cell (via a T cell receptor). A “B-cell epitope” is an epitope that is specifically bound by an antibody (or B cell receptor molecule).

[063] An “adjuvant” is an agent that enhances the production of an immune response in a non-specific manner. Common adjuvants include suspensions of minerals (alum, aluminum hydroxide, aluminum phosphate) onto which antigen is adsorbed; emulsions, including water-in-oil, and oil-in-water (and variants thereof, including double emulsions and reversible emulsions), liposaccharides, lipopolysaccharides, immunostimulatory nucleic acids (such as CpG oligonucleotides), liposomes, Toll-like Receptor agonists (particularly, TLR2, TLR4, TLR7/8 and TLR9 agonists), and various combinations of such components.

[064] An “immunogenic composition” is a composition of matter suitable for administration to a human or animal subject (*e.g.*, in an experimental setting) that is capable of eliciting a specific immune response, *e.g.*, against a pathogen, such as RSV. As such, an immunogenic composition includes one or more antigens (for example, polypeptide antigens) or antigenic epitopes. An immunogenic composition can also include one or more additional components capable of eliciting or enhancing an immune response, such as an excipient, carrier, and/or adjuvant. In certain instances, immunogenic compositions are administered to elicit an immune response that protects the subject against symptoms or conditions induced by a pathogen. In some cases, symptoms or disease caused by a pathogen is prevented (or reduced or ameliorated) by inhibiting replication of the pathogen (*e.g.*, RSV) following exposure of the subject to the pathogen. In the context of this disclosure, the term immunogenic composition will be understood to encompass compositions that are intended for administration to a subject or population of subjects for the purpose of eliciting a protective or palliative immune response against RSV (that is, vaccine compositions or vaccines).

[065] An “immune response” is a response of a cell of the immune system, such as a B cell, T cell, or monocyte, to a stimulus. An immune response can be a B cell response, which results in the production of specific antibodies, such as antigen specific neutralizing antibodies. An immune response can also be a T cell response, such as a CD4+ response or a CD8+ response. In some cases, the response is specific for a particular antigen (that is, an “antigen-specific response”). If the antigen is derived from a pathogen, the antigen-specific response is a “pathogen-specific response.” A “protective immune response” is an immune response that inhibits a detrimental function or activity of a pathogen, reduces infection by a pathogen, or decreases symptoms (including death) that result from infection by the pathogen. A protective immune response can be measured, for example, by the inhibition of viral replication or plaque formation in a plaque reduction assay or ELISA-neutralization assay, or by measuring resistance to pathogen challenge *in vivo*.

[066] A “Th1” biased immune response is characterized by the presence of CD4+ T helper cells that produce IL-2 and IFN- γ , and thus, by the secretion or presence of IL-2 and IFN- γ . In contrast, a “Th2” biased immune response is characterized by a preponderance of CD4+ helper cells that produce IL-4, IL-5, and IL-13.

[067] An “immunologically effective amount” is a quantity of a composition (typically, an immunogenic composition) used to elicit an immune response in a subject to the

composition or to an antigen in the composition. Commonly, the desired result is the production of an antigen (*e.g.*, pathogen)-specific immune response that is capable of or contributes to protecting the subject against the pathogen. However, to obtain a protective immune response against a pathogen can require multiple administrations of the immunogenic composition. Thus, in the context of this disclosure, the term immunologically effective amount encompasses a fractional dose that contributes in combination with previous or subsequent administrations to attaining a protective immune response.

[068] The adjective “pharmaceutically acceptable” indicates that the referent is suitable for administration to a subject (*e.g.*, a human or animal subject). Remington’s Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), describes compositions and formulations (including diluents) suitable for pharmaceutical delivery of therapeutic and/or prophylactic compositions, including immunogenic compositions.

[069] The term “modulate” in reference to a response, such as an immune response, means to alter or vary the onset, magnitude, duration or characteristics of the response. An agent that modulates an immune response alters at least one of the onset, magnitude, duration or characteristics of an immune response following its administration, or that alters at least one of the onset, magnitude, duration or characteristic as compared to a reference agent.

[070] The term “reduces” is a relative term, such that an agent reduces a response or condition if the response or condition is quantitatively diminished following administration of the agent, or if it is diminished following administration of the agent, as compared to a reference agent. Similarly, the term “prevents” does not necessarily mean that an agent completely eliminates the response or condition, so long as at least one characteristic of the response or condition is eliminated. Thus, an immunogenic composition that reduces or prevents an infection or a response, such as a pathological response, *e.g.*, vaccine enhanced viral disease, can, but does not necessarily completely eliminate such an infection or response, so long as the infection or response is measurably diminished, for example, by at least about 50%, such as by at least about 70%, or about 80%, or even by about 90% of (that is to 10% or less than) the infection or response in the absence of the agent, or in comparison to a reference agent.

[071] A “subject” is a living multi-cellular vertebrate organism. In the context of this disclosure, the subject can be an experimental subject, such as a non-human animal, *e.g.*, a mouse, a cotton rat, or a non-human primate. Alternatively, the subject can be a human subject.

PreF ANTIGENS

[072] In nature, the RSV F protein is expressed as a single polypeptide precursor 574 amino acids in length, designated F0. *In vivo*, F0 oligomerizes in the endoplasmic reticulum and is proteolytically processed by a furin protease at two conserved furin consensus sequences (furin cleavage sites), RARR¹⁰⁹ (SEQ ID NO:15) and RKRR¹³⁶ (SEQ ID NO:16) to generate an oligomer consisting of two disulfide-linked fragments. The smaller of these fragments is termed F2 and originates from the N-terminal portion of the F0 precursor. It will be recognized by those of skill in the art that the abbreviations F0, F1 and F2 are commonly designated F₀, F₁ and F₂ in the scientific literature. The larger, C-terminal F1 fragment anchors the F protein in the membrane via a sequence of hydrophobic amino acids, which are adjacent to a 24 amino acid cytoplasmic tail. Three F2-F1 dimers associate to form a mature F protein, which adopts a metastable prefusogenic (“prefusion”) conformation that is triggered to undergo a conformational change upon contact with a target cell membrane. This conformational change exposes a hydrophobic sequence, known as the fusion peptide, which associates with the host cell membrane and promotes fusion of the membrane of the virus, or an infected cell, with the target cell membrane.

[073] The F1 fragment contains at least two heptad repeat domains, designated HRA and HRB, and situated in proximity to the fusion peptide and transmembrane anchor domains, respectively. In the prefusion conformation, the F2-F1 dimer forms a globular head and stalk structure, in which the HRA domains are in a segmented (extended) conformation in the globular head. In contrast, the HRB domains form a three-stranded coiled coil stalk extending from the head region. During transition from the prefusion to the postfusion conformations, the HRA domains collapse and are brought into proximity to the HRB domains to form an anti-parallel six helix bundle. In the postfusion state the fusion peptide and transmembrane domains are juxtaposed to facilitate membrane fusion.

[074] Although the conformational description provided above is based on molecular modeling of crystallographic data, the structural distinctions between the prefusion and

postfusion conformations can be monitored without resort to crystallography. For example, electron micrography can be used to distinguish between the prefusion and postfusion (alternatively designated prefusogenic and fusogenic) conformations, as demonstrated by Calder *et al.*, *Virology*, 271:122-131 (2000) and Morton *et al.*, *Virology*, 311:275-288, which are incorporated herein by reference for the purpose of their technological teachings. The prefusion conformation can also be distinguished from the fusogenic (postfusion) conformation by liposome association assays as described by Connolly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:17903-17908 (2006), which is also incorporated herein by reference for the purpose of its technological teachings. Additionally, prefusion and fusogenic conformations can be distinguished using antibodies (*e.g.*, monoclonal antibodies) that specifically recognize conformation epitopes present on one or the other of the prefusion or fusogenic form of the RSV F protein, but not on the other form. Such conformation epitopes can be due to preferential exposure of an antigenic determinant on the surface of the molecule. Alternatively, conformational epitopes can arise from the juxtaposition of amino acids that are non-contiguous in the linear polypeptide.

[075] The PreF antigens disclosed herein are designed to stabilize and maintain the prefusion conformation of the RSV F protein, such that in a population of expressed protein, a substantial portion of the population of expressed protein is in the prefusogenic (prefusion) conformation (*e.g.*, as predicted by structural and/or thermodynamic modeling or as assessed by one or more of the methods disclosed above). Stabilizing modifications are introduced into a native (or synthetic) F protein, such as the exemplary F protein of SEQ ID NO:2, such that the major immunogenic epitopes of the prefusion conformation of the F protein are maintained following introduction of the PreF antigen into a cellular or extracellular environment (for example, *in vivo*, *e.g.*, following administration to a subject).

[076] First, a heterologous stabilizing domain can be placed at the C-terminal end of the construct in order to replace the membrane anchoring domain of the F0 polypeptide. This stabilizing domain is predicted to compensate for the HRB instability, helping to stabilize the -prefusion conformer. In exemplary embodiments, the heterologous stabilizing domain is a protein multimerization domain. One particularly favorable example of such a protein multimerization domain is a trimerization domain. Exemplary trimerization

domains fold into a coiled-coil that promotes assembly into trimers of multiple polypeptides having such coiled-coil domains. One favorable example of a trimerization domain is an isoleucine zipper. An exemplary isoleucine zipper domain is the engineered yeast GCN4 isoleucine variant described by *Harbury et al. Science* 262:1401-1407 (1993). The sequence of one suitable isoleucine zipper domain is represented by SEQ ID NO:11, although variants of this sequence that retain the ability to form a coiled-coil stabilizing domain are equally suitable. Alternative stabilizing coiled coil trimerization domains include: TRAF2 (GENBANK® Accession No. Q12933 [gi:23503103]; amino acids 299-348); Thrombospondin 1 (Accession No. PO7996 [gi:135717]; amino acids 291-314); Matrilin-4 (Accession No. O95460 [gi:14548117]; amino acids 594-618; CMP (matrilin-1) (Accession No. NP_002370 [gi:4505111]; amino acids 463-496; HSF1 (Accession No. AAX42211 [gi:61362386]; amino acids 165-191; and Cubilin (Accession No. NP_001072 [gi:4557503]; amino acids 104-138. It is expected that a suitable trimerization domain results in the assembly of a substantial portion of the expressed protein into trimers. For example, at least 50% of a recombinant PreF polypeptide having a trimerization domain will assemble into a trimer (*e.g.*, as assessed by AFF-MALS). Typically, at least 60%, more favorably at least 70%, and most desirably at least about 75% or more of the expressed polypeptide exists as a trimer.

[077] In order to stabilize HRB even more, the leucine residue located at position 512 (relative to the native F0 protein) of the PreF can be substituted by a lysine (L482K of the exemplary PreF antigen polypeptide of SEQ ID NO:6). This substitution improves the coiled coil hydrophobic residue periodicity. Similarly, a lysine can be added following the amino acid at position 105.

[078] Secondly, pep27 can be removed. Analysis of a structural model of the RSV F protein in the prefusion state suggests that pep27 creates a large unconstrained loop between F1 and F2. This loop does not contribute to stabilization of the prefusion state, and is removed following cleavage of the native protein by furin.

[079] Third, one or both furin cleavage motifs can be deleted. With this design, the fusion peptide is not cleaved from F2, preventing release from the globular head of the prefusion conformer and accessibility to nearby membranes. Interaction between the fusion peptide and the membrane interface is predicted to be a major issue in the prefusion state instability. During the fusion process, interaction between the fusion peptide and the

target membrane results in the exposure of the fusion peptide from within the globular head structure, enhancing instability of the prefusion state and folding into post-fusion conformer. This conformation change enables the process of membrane fusion. Removal of one or both of the furin cleavage sites is predicted to prevent membrane accessibility to the N-terminal part of the fusion peptide, stabilizing the prefusion state. Thus, in exemplary embodiments disclosed herein, removal of the furin cleavage motifs results in a PreF antigen that comprises an intact fusion peptide, which is not cleaved by furin during or following processing and assembly.

[080] Optionally, at least one non-furin cleavage site can also be removed, for example by substitution of one or more amino acids. For example, experimental evidence suggests that under conditions conducive to cleavage by certain metalloproteinases, the PreF antigen can be cleaved in the vicinity of amino acids 110-118 (for example, with cleavage occurring between amino acids 112 and 113 of the PreF antigen; between a leucine at position 142 and glycine at position 143 of the reference F protein polypeptide of SEQ ID NO:2). Accordingly, modification of one or more amino acids within this region can reduce cleavage of the PreF antigen. For example, the leucine at position 112 can be substituted with a different amino acid, such as isoleucine, glutamine or tryptophan (as shown in the exemplary embodiment of SEQ ID NO:20). Alternatively or additionally, the glycine at position 113 can be substituted by a serine or alanine.

[081] Optionally, a PreF antigen can include one or more modifications that alters the glycosylation pattern or status (*e.g.*, by increasing or decreasing the proportion of molecules glycosylated at one or more of the glycosylation sites present in a native F protein polypeptide. For example, the native F protein polypeptide of SEQ ID NO:2 is predicted to be glycosylated at amino acid positions 27, 70 and 500 (corresponding to positions 27, 70 and 470 of the exemplary PreF antigen of SEQ ID NO:6). In an embodiment, a modification is introduced in the vicinity of the glycosylation site at amino acid position 500 (designated N470). For example, the glycosylation site can be removed by substituting an amino acid, such as glutamine (Q) in place of the asparagine at position 500 (of the reference sequence, which corresponds by alignment to position 470 of the exemplary PreF antigen). Favorably, a modification that increases glycosylation efficiency at this glycosylation site is introduced. Examples of suitable modifications include at positions 500-502, the following amino acid sequences: NGS; NKS; NGT;

NKT. Interestingly, it has been found that modifications of this glycosylation site that result in increased glycosylation also result in substantially increased PreF production. Thus, in certain embodiments, the PreF antigens have a modified glycosylation site at the position corresponding to amino acid 500 of the reference PreF sequence (SEQ ID NO:2), *e.g.*, at position 470 of the PreF antigen exemplified by SEQ ID NO:6). Suitable modifications include the sequences: NGS; NKS; NGT; NKT at amino acids corresponding to positions 500-502 of the reference F protein polypeptide sequence. The amino acid of an exemplary embodiment that includes an "NGT" modification is provided in SEQ ID NO:18. One of skill in the art can easily determine similar modifications for corresponding NGS, NKS, and NKT modifications. Such modifications are favorably combined with any of the stabilizing mutations disclosed herein (*e.g.*, a heterologous coiled-coil, such as an isoleucine zipper, domain and/or a modification in a hydrophobic region, and/or removal of pep27, and/or removal of a furin cleavage site, and/or removal of a non-furin cleavage site, and/or removal of a non-furin cleavage site). For example, in one specific embodiment, the PreF antigen includes a substitution that eliminates a non-furin cleavage site and a modification that increases glycosylation. An exemplary sequence is provided in SEQ ID NO:22 (which exemplary embodiment includes an "NGT" modification and the substitution of glutamine in the place of leucine at position 112).

[082] More generally, any one of the stabilizing modifications disclosed herein, *e.g.*, addition of a heterologous stabilizing domain, such as a coiled-coil (for example, an isoleucine zipper domain), preferably situated at the C-terminal end of the soluble PreF antigen; modification of a residue, such as leucine to lysine, in the hydrophobic HRB domain; removal of pep27; removal of one or both furin cleavage motifs; removal of a non-furin cleavage site; and/or modification of a glycosylation site can be employed in combination with any one or more (or up to all-in any desired combination) of the other stabilizing modifications. For example, a heterologous coiled-coil (or other heterologous stabilizing domain) can be utilized alone or in combination with any of: a modification in a hydrophobic region, and/or removal of pep27, and/or removal of a furin cleavage site, and/or removal of a non-furin cleavage site, and/or removal of a non-furin cleavage site. In certain specific embodiments, the PreF antigen includes a C-terminal coiled-coil (isoleucine zipper) domain, a stabilizing substitution in the HRB hydrophobic domain, and removal of one or both furin cleavage sites. Such an embodiment includes an intact fusion

peptide that is not removed by furin cleavage. In one specific embodiment, the PreF antigen also includes a modified glycosylation site at amino acid position 500.

[083] The native F protein polypeptide can be selected from any F protein of an RSV A or RSV B strain, or from variants thereof (as defined above). In certain exemplary embodiments, the F protein polypeptide is the F protein represented by SEQ ID NO:2. To facilitate understanding of this disclosure, all amino acid residue positions, regardless of strain, are given with respect to (that is, the amino acid residue position corresponds to) the amino acid position of the exemplary F protein. Comparable amino acid positions of any other RSV A or B strain can be determined easily by those of ordinary skill in the art by aligning the amino acid sequences of the selected RSV strain with that of the exemplary sequence using readily available and well-known alignment algorithms (such as BLAST, *e.g.*, using default parameters). Numerous additional examples of F protein polypeptides from different RSV strains are disclosed in WO2008114149 (which is incorporated herein by reference for the purpose of providing additional examples of RSV F and G protein sequences). Additional variants can arise through genetic drift, or can be produced artificially using site directed or random mutagenesis, or by recombination of two or more preexisting variants. Such additional variants are also suitable in the context of the PreF (and PreF-G) antigens disclosed herein.

[084] In selecting F2 and F1 domains of the F protein, one of skill in the art will recognize that it is not strictly necessary to include the entire F2 and/or F1 domain. Typically, conformational considerations are of importance when selecting a subsequence (or fragment) of the F2 domain. Thus, the F2 domain typically includes a portion of the F2 domain that facilitates assembly and stability of the polypeptide. In certain exemplary variants, the F2 domain includes amino acids 26-105. However, variants having minor modifications in length (by addition, or deletion of one or more amino acids) are also possible.

[085] Typically, at least a subsequence (or fragment) of the F1 domain is selected and designed to maintain a stable conformation that includes immunodominant epitopes of the F protein. For example, it is generally desirable to select a subsequence of the F1 polypeptide domain that includes epitopes recognized by neutralizing antibodies in the regions of amino acids 262-275 (palivizumab neutralization) and 423-436 (Centocor's ch101F MAb). Additionally, desirable to include T cell epitopes, *e.g.*, in the region of

amino acids 328-355. Most commonly, as a single contiguous portion of the F1 subunit (*e.g.*, spanning amino acids 262-436) but epitopes could be retained in a synthetic sequence that includes these immunodominant epitopes as discontinuous elements assembled in a stable conformation. Thus, an F1 domain polypeptide comprises at least about amino acids 262-436 of an RSV F protein polypeptide. In one non-limiting example provided herein, the F1 domain comprises amino acids 137 to 516 of a native F protein polypeptide. One of skill in the art will recognize that additional shorter subsequences can be used at the discretion of the practitioner.

[086] When selecting a subsequence of the F2 or F1 domain (or as will be discussed below with respect to the G protein component of certain PreF-G antigens), in addition to conformational consideration, it can be desirable to choose sequences (*e.g.*, variants, subsequences, and the like) based on the inclusion of additional immunogenic epitopes. For example, additional T cell epitopes can be identified using anchor motifs or other methods, such as neural net or polynomial determinations, known in the art, see, *e.g.*, RANKPEP (available on the world wide web at: mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html); ProPredI (available on the world wide web at: imtech.res.in/raghava/propredI/index.html); Bimas (available on the world wide web at: www.bimas.dcert.nih.gov/molbi/hla_bind/index.html); and SYFPEITH (available on the world wide web at: syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm). For example, algorithms are used to determine the “binding threshold” of peptides, and to select those with scores that give them a high probability of MHC or antibody binding at a certain affinity. The algorithms are based either on the effects on MHC binding of a particular amino acid at a particular position, the effects on antibody binding of a particular amino acid at a particular position, or the effects on binding of a particular substitution in a motif-containing peptide. Within the context of an immunogenic peptide, a “conserved residue” is one which appears in a significantly higher frequency than would be expected by random distribution at a particular position in a peptide. Anchor residues are conserved residues that provide a contact point with the MHC molecule. T cell epitopes identified by such predictive methods can be confirmed by measuring their binding to a specific MHC protein and by their ability to stimulate T cells when presented in the context of the MHC protein.

[087] Favorably, the PreF antigens (including PreF-G antigens as discussed below) include a signal peptide corresponding to the expression system, for example, a

mammalian or viral signal peptide, such as an RSV F0 native signal sequence (*e.g.*, amino acids 1-25 of SEQ ID NO:2 or amino acids 1-25 of SEQ ID NO:6). Typically, the signal peptide is selected to be compatible with the cells selected for recombinant expression. For example, a signal peptide (such as a baculovirus signal peptide, or the melittin signal peptide, can be substituted for expression, in insect cells. Suitable plant signal peptides are known in the art, if a plant expression system is preferred. Numerous exemplary signal peptides are known in the art, (*sec, e.g., see Zhang & Henzel, Protein Sci.*, 13:2819-2824 (2004), which describes numerous human signal peptides) and are catalogued, *e.g.*, in the SPdb signal peptide database, which includes signal sequences of archaea, prokaryotes and eukaryotes (<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>). Optionally, any of the preceding antigens can include an additional sequence or tag, such as a His-tag to facilitate purification.

[088] Optionally, the PreF antigen can include additional immunogenic components. In certain particularly favorable embodiments, the PreF antigen includes an RSV G protein antigenic component. Exemplary chimeric proteins having a PreF and G component include the following PreF_V1 (represented by SEQ ID NOs:7 and 8) and PreF_V2 (represented by SEQ ID NOs:9 and 10).

[089] In the PreF-G antigens, an antigenic portion of the G protein (*e.g.*, a truncated G protein, such as amino acid residues 149-229) is added at the C-terminal end of the construct. Typically, the G protein component is joined to the F protein component via a flexible linker sequence. For example, in the exemplary PreF_V1 design, the G protein is joined to the PreF component by a -GGSGGSGGS- linker (SEQ ID NO:14). In the PreF_V2 design, the linker is shorter. Instead of having the -GGSGGSGGS- linker (SEQ ID NO:14), PreF_V2 has 2 glycines (-GG-) for linker.

[090] Where present, the G protein polypeptide domain can include all or part of a G protein selected from any RSV A or RSV B strain. In certain exemplary embodiments, the G protein is (or is 95% identical to) the G protein represented by SEQ ID NO:4. Additional examples of suitable G protein sequences can be found in WO2008114149 (which is incorporated herein by reference).

[091] The G protein polypeptide component is selected to include at least a subsequence (or fragment) of the G protein that retains the immunodominant T cell epitope(s), *e.g.*, in the region of amino acids 183-197, such as fragments of the G protein that include amino

acids 151-229, 149-229, or 128-229 of a native G protein. In one exemplary embodiment, the G protein polypeptide is a subsequence (or fragment) of a native G protein polypeptide that includes all or part of amino acid residues 149 to 229 of a native G protein polypeptide. One of skill in the art will readily appreciate that longer or shorter portions of the G protein can also be used, so long as the portion selected does not conformationally destabilize or disrupt expression, folding or processing of the PreF-G antigen. Optionally, the G protein domain includes an amino acid substitution at position 191, which has previously been shown to be involved in reducing and/or preventing enhanced disease characterized by eosinophilia associated with formalin inactivated RSV vaccines. A thorough description of the attributes of naturally occurring and substituted (N191A) G proteins can be found, *e.g.*, in US Patent Publication No. 2005/0042230, which is incorporated herein by reference.

[092] For example, with respect to selection of sequences corresponding to naturally occurring strains, one or more of the domains can correspond in sequence to an RSV A or B strain, such as the common laboratory isolates designated A2 or Long, or any other naturally occurring strain or isolate (as disclosed in the aforementioned WO2008114149). In addition to such naturally occurring and isolated variants, engineered variants that share sequence similarity with the aforementioned sequences can also be employed in the context of PreF (including PreF-G) antigens. It will be understood by those of skill in the art, that the similarity between PreF antigen polypeptide (and polynucleotide sequences as described below), as for polypeptide (and nucleotide sequences in general), can be expressed in terms of the similarity between the sequences, otherwise referred to as sequence identity. Sequence identity is frequently measured in terms of percentage identity (or similarity); the higher the percentage, the more similar are the primary structures of the two sequences. In general, the more similar the primary structures of two amino acid (or polynucleotide) sequences, the more similar are the higher order structures resulting from folding and assembly. Variants of a PreF polypeptide (and polynucleotide) sequences typically have one or a small number of amino acid deletions, additions or substitutions but will nonetheless share a very high percentage of their amino acid, and generally their polynucleotide sequence. More importantly, the variants retain the structural and, thus, conformational attributes of the reference sequences disclosed herein.

[093] Methods of determining sequence identity are well known in the art, and are applicable to PreF antigen polypeptides, as well as the nucleic acids that encode them (e.g., as described below). Various programs and alignment algorithms are described in: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; and Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988. Altschul *et al.*, *Nature Genet.* 6:119, 1994, presents a detailed consideration of sequence alignment methods and homology calculations. The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) is available from several sources, including the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) and on the internet, for use in connection with the sequence analysis programs blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx. A description of how to determine sequence identity using this program is available on the NCBI website on the internet.

[094] In some instances, the PreF antigens has one or more amino acid modification relative to the amino acid sequence of the naturally occurring strain from which it is derived (e.g., in addition to the aforementioned stabilizing modifications). Such differences can be an addition, deletion or substitution of one or more amino acids. A variant typically differs by no more than about 1%, or 2%, or 5%, or 10%, or 15%, or 20% of the amino acid residues. For example, a variant PreF antigen (including PreF-G) polypeptide sequence can include 1, or 2, or up to 5, or up to about 10, or up to about 15, or up to about 50, or up to about 100 amino acid differences as compared to the exemplary PreF antigen polypeptide sequences of SEQ ID NOs:6, 8, 10, 18, 20 and/or 22. Thus, a variant in the context of an RSV F or G protein, or PreF antigen (including PreF-G antigen), typically shares at least 80%, or 85%, more commonly, at least about 90% or more, such as 95%, or even 98% or 99% sequence identity with a reference protein, e.g., the reference sequences illustrated in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 18, 20 and/or 22, or any of the exemplary PreF antigens disclosed herein. Additional variants included as a feature of this disclosure are PreF antigens (including PreF-G antigens) that include all or part of a nucleotide or amino acid sequence selected from the naturally occurring variants disclosed in WO2008114149. Additional variants can arise through genetic drift, or can be produced artificially using site directed or random mutagenesis, or by recombination of two or more preexisting variants. Such additional variants are also suitable in the context

of the PreF (and PreF-G) antigens disclosed herein. For example, the modification can be a substitution of one or more amino acids (such as two amino acids, three amino acids, four amino acids, five amino acids, up to about ten amino acids, or more) that do not alter the conformation or immunogenic epitopes of the resulting PreF antigen.

[095] Alternatively or additionally, the modification can include a deletion of one or more amino acids and/or an addition of one or more amino acids. Indeed, if desired, one or more of the polypeptide domains can be a synthetic polypeptide that does not correspond to any single strain, but includes component subsequences from multiple strains, or even from a consensus sequence deduced by aligning multiple strains of RSV virus polypeptides. In certain embodiments, one or more of the polypeptide domains is modified by the addition of an amino acid sequence that constitutes a tag, which facilitates subsequent processing or purification. Such a tag can be an antigenic or epitope tag, an enzymatic tag or a polyhistidine tag. Typically the tag is situated at one or the other end of the protein, such as at the C-terminus or N-terminus of the antigen or fusion protein.

NUCLEIC ACIDS THAT ENCODE PREF ANTIGENS

[096] Another aspect of this disclosure concerns recombinant nucleic acids that encode PreF antigens as described above. More explicitly, such nucleic acids encode polypeptides that include a soluble F protein polypeptide antigen that includes an F2 domain and an F1 domain of an RSV F protein polypeptide, which includes at least one modification selected from: (i) an addition of an amino acid sequence comprising a heterologous trimerization domain; (ii) a deletion of at least one furin cleavage site; (iii) a deletion of at least one non-furin cleavage site; (iv) a deletion of one or more amino acids of the pep27 domain; and, (v) at least one substitution or addition of a hydrophilic amino acid in a hydrophobic domain of the F protein extracellular domain. Optionally, such a polynucleotide encodes a PreF antigen with a modification in a glycosylation site. The nature and structural details of such polypeptides are disclosed in detail above. One of skill in the art will readily be able to determine nucleotide sequences that encode any and all of the described polypeptide sequences based on the teachings herein, including the exemplary sequences provided in the sequence listing, and otherwise included (*e.g.*, by incorporation by reference) in this disclosure.

[097] In certain embodiments, the recombinant nucleic acids are codon optimized for expression in a selected prokaryotic or eukaryotic host cell. For example, SEQ ID NOs: 5,

12, 17, 19 and 21 are different illustrative, non-limiting, examples of sequences that encode a PreF antigen, which have been codon optimized for expression in mammalian, *e.g.*, CHO, cells. To facilitate replication and expression, the nucleic acids can be incorporated into a vector, such as a prokaryotic or a eukaryotic expression vector. Host cells including recombinant PreF antigen-encoding nucleic acids are also a feature of this disclosure. Favorable host cells include prokaryotic (*i.e.*, bacterial) host cells, such as *E. coli*, as well as numerous eukaryotic host cells, including fungal (*e.g.*, yeast) cells, insect cells, and mammalian cells (such as CHO, VERO and HEK293 cells).

[098] To facilitate replication and expression, the nucleic acids can be incorporated into a vector, such as a prokaryotic or a eukaryotic expression vector. Although the nucleic acids disclosed herein can be included in any one of a variety of vectors (including, for example, bacterial plasmids; phage DNA; baculovirus; yeast plasmids; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA, viral DNA such as vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, pseudorabies, adenovirus, adeno-associated virus, retroviruses and many others), most commonly the vector will be an expression vector suitable for generating polypeptide expression products. In an expression vector, the nucleic acid encoding the PreF antigen is typically arranged in proximity and orientation to an appropriate transcription control sequence (promoter, and optionally, one or more enhancers) to direct mRNA synthesis. That is, the polynucleotide sequence of interest is operably linked to an appropriate transcription control sequence. Examples of such promoters include: the immediate early promoter of CMV, LTR or SV40 promoter, polyhedrin promoter of baculovirus, *E. coli* lac or trp promoter, phage T7 and lambda P_L promoter, and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses. The expression vector typically also contains a ribosome binding site for translation initiation, and a transcription terminator. The vector optionally includes appropriate sequences for amplifying expression. In addition, the expression vectors optionally comprise one or more selectable marker genes to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells, such as dihydrofolate reductase or neomycin resistance for eukaryotic cell culture, or such as kanamycin, tetracycline or ampicillin resistance in *E. coli*.

[099] The expression vector can also include additional expression elements, for example, to improve the efficiency of translation. These signals can include, *e.g.*, an ATG

initiation codon and adjacent sequences. In some cases, for example, a translation initiation codon and associated sequence elements are inserted into the appropriate expression vector simultaneously with the polynucleotide sequence of interest (*e.g.*, a native start codon). In such cases, additional translational control signals are not required. However, in cases where only a polypeptide-coding sequence, or a portion thereof, is inserted, exogenous translational control signals, including an ATG initiation codon is provided for translation of the nucleic acid encoding PreF antigen. The initiation codon is placed in the correct reading frame to ensure translation of the polynucleotide sequence of interest. Exogenous transcriptional elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. If desired, the efficiency of expression can be further increased by the inclusion of enhancers appropriate to the cell system in use (Scharf *et al.* (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bitter *et al.* (1987) Methods in Enzymol 153:516-544).

[0100] In some instances, the nucleic acid (such as a vector) that encodes the PreF antigen includes one or more additional sequence elements selected to increase and/or optimize expression of the PreF encoding nucleic acid when introduced into a host cell. For example, in certain embodiments, the nucleic acids that encode the PreF antigen include an intron sequence, such as a Human Herpesvirus 5 intron sequence (*see, e.g.*, SEQ ID NO:13). Introns have been repeatedly demonstrated to enhance expression of homologous and heterologous nucleic acids when appropriately positioned in a recombinant construct. Another class of expression-enhancing sequences includes an epigenetic element such as a Matrix Attachment Region (or MAR), or a similar epigenetic element, *e.g.*, STAR elements (for example, such as those STAR elements disclosed in Otte *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 23:801-807, 2007). Without being bound by theory, MARs are believed to mediate the anchorage of a target DNA sequence to the nuclear matrix, generating chromatin loop domains that extend outwards from the heterochromatin cores. While MARs do not contain any obvious consensus or recognizable sequence, their most consistent feature appears to be an overall high A/T content, and C bases predominating on one strand. These regions appear to form bent secondary structures that may be prone to strand separation, and may include a core-unwinding element (CUE) that can serve as the nucleation point for strand separation. Several simple AT-rich sequence motifs have been associated with MAR sequences: *e.g.*, the A-box, the T-box, DNA unwinding motifs, SATB1 binding sites (H-box, A/T/C25) and consensus Topoisomerase II sites for vertebrates or *Drosophila*. Exemplary MAR sequences are described in published US

patent application no. 20070178469, and in international patent application no. WO02/074969 (which are incorporated herein by reference). Additional MAR sequences that can be used to enhance expression of a nucleic acid encoding a PreF antigen include chicken lysozyme MAR, MARp1-42, MARp1-6, MARp1-68, and MARpx-29, described in Girod *et al.*, *Nature Methods*, 4:747-753, 2007 (disclosed in GenBank Accession Nos. EA423306, DI107030, DI106196, DI107561, and DI106512, respectively). One of skill will appreciate that expression can further be modulated by selecting a MAR that produces an intermediate level of enhancement, as is reported for MAR 1-9. If desired, alternative MAR sequences for increasing expression of a PreF antigen can be identified by searching sequence databases, for example, using software such as MAR-Finder (available on the web at futuresoft.org/MarFinder), SMARTest (available on the web at genomatix.de), or SMARScan I (Levitsky *et al.*, *Bioinformatics* 15:582-592, 1999). In certain embodiments, the MAR is introduced (*e.g.*, transfected) into the host cell on the same nucleic acid (*e.g.*, vector) as the PreF antigen-encoding sequence. In an alternative embodiment, the MAR is introduced on a separate nucleic acid (*e.g.*, in trans) and it can optionally cointegrate with the PreF antigen-encoding polynucleotide sequence.

[0101] Exemplary procedures sufficient to guide one of ordinary skill in the art through the production of recombinant PreF antigen nucleic acids can be found in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (and Supplements to 2003); and Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., Wiley & Sons, 1999.

[0102] Exemplary nucleic acids that encode PreF antigen polypeptides are represented by SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and 21. Variants that include a modification in a glycosylation site, *e.g.*, at the amino acid corresponding to position 500 of SEQ ID NO:2 can be produced by altering (*e.g.*, mutating) the nucleotides in the vicinity of positions 1408-1414 (as compared, for example, to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12, *e.g.*, SEQ ID NOs:17 and 21). Suitable sequences of nucleotides to encode glycosylation variants (*e.g.*, that increase glycosylation efficiency) include: aacgggt, aacaagt, aacggga, and aacaaga. Alternative sequences, such as cagcagt, which eliminate a glycosylation site

are also possible. Additional variants of can be produced by assembling analogous F and G protein polypeptide sequences selected from any of the known (or subsequently) discovered strains of RSV, *e.g.*, as disclosed in WO2008114149. Additional sequence variants that share sequence identity with the exemplary variants can be produced by those of skill in the art. Typically, the nucleic acid variants will encode polypeptides that differ by no more than 1%, or 2%, or 5%, or 10%, or 15%, or 20% of the amino acid residues. That is, the encoded polypeptides share at least 80%, or 85%, more commonly, at least about 90% or more, such as 95%, or even 98% or 99% sequence identity. It will be immediately understood by those of skill in the art, that the polynucleotide sequences encoding the PreF polypeptides, can themselves share less sequence identity due to the redundancy of the genetic code. In some instances, the PreF antigens has one or more amino acid modification relative to the amino acid sequence of the naturally occurring strain from which it is derived (*e.g.*, in addition to the aforementioned stabilizing modifications). Such differences can be an addition, deletion or substitution of one or more nucleotides or amino acids, respectively. A variant typically differs by no more than about 1%, or 2%, or 5%, or 10%, or 15%, or 20% or of the nucleotide residues. For example, a variant PreF antigen (including PreF-G) nucleic acid can include 1, or 2, or up to 5, or up to about 10, or up to about 15, or up to about 50, or up to about 100 nucleotide differences as compared to the exemplary PreF antigen nucleic acids of SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and/or 21. Thus, a variant in the context of an RSV F or G protein, or PreF antigen (including PreF-G antigen) nucleic acid, typically shares at least 80%, or 85%, more commonly, at least about 90% or more, such as 95%, or even 98% or 99% sequence identity with a reference sequence, *e.g.*, the reference sequences illustrated in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and/or 21, or any of the other exemplary PreF antigen nucleic acids disclosed herein. Additional variants included as a feature of this disclosure are PreF antigens (including PreF-G antigens) that include all or part of a nucleotide sequence selected from the naturally occurring variants disclosed in WO2008114149. Additional variants can arise through genetic drift, or can be produced artificially using site directed or random mutagenesis, or by recombination of two or more preexisting variants. Such additional variants are also suitable in the context of the PreF (and PreF-G) antigens disclosed herein.

[0103] In addition to the variant nucleic acids previously described, nucleic acids that hybridize to one or more of the exemplary nucleic acids represented by SEQ ID NOs:1, 3,

5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and/or 21 can also be used to encode PreF antigens. One of skill in the art will appreciate that in addition to the % sequence identity measure discussed above, another indicia of sequence similarity between two nucleic acids is the ability to hybridize. The more similar are the sequences of the two nucleic acids, the more stringent the conditions at which they will hybridize. The stringency of hybridization conditions are sequence-dependent and are different under different environmental parameters. Thus, hybridization conditions resulting in particular degrees of stringency will vary depending upon the nature of the hybridization method of choice and the composition and length of the hybridizing nucleic acid sequences. Generally, the temperature of hybridization and the ionic strength (especially the Na^+ and/or Mg^{++} concentration) of the hybridization buffer will determine the stringency of hybridization, though wash times also influence stringency. Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C to 20°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Conditions for nucleic acid hybridization and calculation of stringencies can be found, for example, in Sambrook *et al.*, *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. and Ausubel *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

[0104] For purposes of the present disclosure, “stringent conditions” encompass conditions under which hybridization will only occur if there is less than 25% mismatch between the hybridization molecule and the target sequence. “Stringent conditions” can be broken down into particular levels of stringency for more precise definition. Thus, as used herein, “moderate stringency” conditions are those under which molecules with more than 25% sequence mismatch will not hybridize; conditions of “medium stringency” are those under which molecules with more than 15% mismatch will not hybridize, and conditions of “high stringency” are those under which sequences with more than 10% mismatch will not hybridize. Conditions of “very high stringency” are those under which sequences with more than 6% mismatch will not hybridize. In contrast, nucleic acids that hybridize under “low stringency conditions include those with much less sequence identity, or with sequence identity over only short subsequences of the nucleic acid. It

will, therefore, be understood that the various variants of nucleic acids that are encompassed by this disclosure are able to hybridize to at least one of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and/or 21 over substantially their entire length.

METHODS OF PRODUCING RSV ANTIGENIC POLYPEPTIDES

[0105] The PreF antigens (including PreF-G antigens, and also where applicable, G antigens) disclosed herein are produced using well established procedures for the expression and purification of recombinant proteins. Procedures sufficient to guide one of skill in the art can be found in the following references: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; and Ausubel *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 999. Additional and specific details are provided hereinbelow.

[0106] Recombinant nucleic acids that encode the PreF antigens are introduced into host cells by any of a variety of well-known procedures, such as electroporation, liposome mediated transfection (*e.g.*, using a commercially available liposomal transfection reagent, such as LIPOFECTAMINE™2000 or TRANSFECTIN™), Calcium phosphate precipitation, infection, transfection and the like, depending on the selection of vectors and host cells. Exemplary nucleic acids that encode PreF antigens (including PreF-G antigens) are provided in SEQ ID NOs:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and 21. One of skill in the art will appreciate that SEQ ID NOs:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and 21 are illustrative and not intended to be limiting. For example, polynucleotide sequences that encode the same proteins as SEQ ID NOs:5, 7 and 9, (*e.g.*, represented by SEQ ID NOs: 6, 8 and 10), but that differ only by the redundancy of the genetic code (such as by alternative codon optimization, as shown in SEQ ID NO:12), can easily be used instead of the exemplary sequences of SEQ ID NOs:5, 7, and 9. The same is true of SEQ ID NOs:17, 19 and 21. Similarly, polynucleotide sequences that include expression-enhancing elements, such as internally positioned introns (or by the addition of promoter, enhancer, intron or other similar elements), as illustrated in SEQ ID NO:13, can be employed. One of ordinary skill in the art will recognize that combinations of such modifications are likewise suitable. Similarly, homologous sequences selected from any RSV A or RSV B strain, and/or other sequences that share substantial sequence identity, as discussed above, can also be used to express PreF antigens. Indeed, any of the variant nucleic acids previously disclosed can

suitably be introduced into host cells and used to produce PreF antigens (including PreF-G antigens) and where applicable G polypeptides.

[0107] For example, in certain instances the variant nucleic acids are modified to alter the glycosylation pattern, e.g., as described above by substitution of one or more amino acids in the vicinity of amino acid position 500 (with respect to SEQ ID NO:2, e.g., SEQ ID NO:17). It has been found that modifying the glycosylation pattern, e.g., in combination with modifying a cleavage recognition site, increases production of the PreF antigen in cell culture. In such cases, the methods described hereinbelow for expressing and isolating recombinant PreF antigens provide a process for increasing the production of a PreF antigen by altering the glycosylation pattern of a PreF antigen by substituting one or more amino acids of a glycosylation recognition site, optionally in combination with modifying one or more cleavage sites (such as a non-furin or furin cleavage recognition site) as described above.

[0108] Host cells that include recombinant PreF antigen-encoding nucleic acids are, thus, also a feature of this disclosure. Favorable host cells include prokaryotic (i.e., bacterial) host cells, such as *E. coli*, as well as numerous eukaryotic host cells, including fungal (e.g., yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*) cells, insect cells, plant cells, and mammalian cells (such as CHO and HEK293 cells). Recombinant PreF antigen nucleic acids are introduced (e.g., transduced, transformed or transfected) into host cells, for example, via a vector, such as an expression vector. As described above, the vector is most typically a plasmid, but such vectors can also be, for example, a viral particle, a phage, etc. Examples of appropriate expression hosts include: bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces*, and *Salmonella typhimurium*; fungal cells, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Neurospora crassa*; insect cells such as *Drosophila* and *Spodoptera frugiperda*; mammalian cells such as 3T3, COS, CHO, BHK, HEK 293 or Bowes melanoma; plant cells, including algae cells, etc. In some instances, transiently transfected cells can be used to produce recombinant PreF antigens. In certain embodiments, cells (e.g., clones) that have stably integrated the PreF nucleic acid are selected and used to produce the recombinant PreF antigen.

[0109] The host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants, or amplifying the inserted polynucleotide sequences. The culture conditions, such as temperature, pH and the like,

are typically those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to those skilled in the art and in the references cited herein, including, *e.g.*, Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley- Liss, New York and the references cited therein. Optionally, the host cells are cultured in serum-free and/or animal product-free medium.

[0110] Expression products corresponding to the nucleic acids of the invention can also be produced in non-animal cells such as plants, yeast, fungi, bacteria and the like. In addition to Sambrook, Berger and Ausubel, details regarding cell culture can be found in Payne *et al.* (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Atlas and Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

[0111] In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the expressed product. For example, when large quantities of a polypeptide or fragments thereof are needed for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified are favorably employed. Such vectors include, but are not limited to, multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene), in which the coding sequence of interest, *e.g.*, a polynucleotide of the invention as described above, can be ligated into the vector in-frame with sequences for the amino-terminal translation initiating Methionine and the subsequent 7 residues of beta-galactosidase producing a catalytically active beta galactosidase fusion protein; pIN vectors (Van Hecke & Schuster (1989) J Biol Chem 264:5503-5509). In certain examples, the nucleic acids are introduced into cells via vectors suitable for introduction and expression in prokaryotic cells, *e.g.*, *E. coli* cells. For example, a nucleic acid including a polynucleotide sequence that encodes a PreF antigen can be introduced into any of a variety of commercially available or proprietary vectors, such as the pET series of expression vectors (*e.g.*, pET9b and pET2d). Expression of the coding sequence is inducible by IPTG, resulting in high levels of protein expression. The polynucleotide sequence encoding the PreF antigen is transcribed under the phage T7 promoter. Alternate vectors, such as pURV22 that include a heat-inducible lambda pL promoter are also suitable.

[0112] The expression vector is then introduced (*e.g.*, by electroporation) into a suitable bacterial host. Numerous suitable strains of *E. coli* are available and can be selected by one of skill in the art (for example, the Rosetta and BL21 (DE3) strains have proven favorable for expression of recombinant vectors containing polynucleotide sequences that encode PreF antigens.

[0113] Similarly, in yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase and PGH can be used for production of the desired expression products. For reviews, *see* Berger, Ausubel, and, *e.g.*, Grant *et al.* (1987; Methods in Enzymology 153:516-544). In mammalian host cells, a number of expression systems, including both plasmid and viral-based systems, can be utilized.

[0114] In another example, the polynucleotide sequence that encodes the PreF antigen is introduced into insect cells using a Baculovirus Expression Vector System (BEVS). Recombinant baculovirus capable of infecting insect cells can be generated using commercially available vectors, kits and/or systems, such as the BD BaculoGold system from BD BioScience. Briefly, the polynucleotide sequence encoding the antigen is inserted into the pAcSG2 transfer vector. Then, host cells SF9 (*Spodoptera frugiperda*) are co-transfected by pAcSG2-chimeric plasmid and BD BaculoGold, containing the linearized genomic DNA of the baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). Following transfection, homologous recombination occurs between the pAcSG2 plasmid and the Baculovirus genome to generate the recombinant virus. In one example, the PreF antigen is expressed under the regulatory control of the polyhedrin promoter (pH). Similar transfer vectors can be produced using other promoters, such as the basic (Ba) and p10 promoters. Similarly, alternative insect cells can be employed, such as SF21 which is closely related to the SF9, and the High Five cell line derived from a cabbage looper, *Trichoplusia ni*.

[0115] More typically, the polynucleotides that encode the PreF antigens are incorporated into expression vectors that are suitable for introduction and expression in eukaryotic (*e.g.*, insect or mammalian cells). Favorably, such nucleic acids are codon optimized for expression in the selected vector/host cell (for example, the sequences illustrated in SEQ ID NOs:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 and 21 are codon optimized for expression in CHO cells). In one exemplary embodiment, the polynucleotide sequence that encodes the PreF antigen

is introduced into a vector, such as the pEE14 vector developed by Lonza Biologicals. The polypeptide is expressed under a constitutive promoter, such as the immediate early CMV (CytoMegaVirus) promoter. Selection of the stably transfected cells expressing the polypeptide is made based on the ability of the transfected cells to grow in the absence of a glutamine source. Cells that have successfully integrated the pEE14 are able to grow in the absence of exogenous glutamine, because the pEE14 vector expresses the GS (Glutamine Synthetase) enzyme. Selected cells can be clonally expanded and characterized for expression of the desired PreF polypeptide.

[0116] A host cell is optionally chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the protein include, but are not limited to, glycosylation, (as well as, *e.g.*, acetylation, carboxylation, phosphorylation, lipidation and acylation). Post-translational processing for example, which cleaves a precursor form into a mature form of the protein (for example, by a furin protease) is optionally performed in the context of the host cell. Different host cells such as 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38, etc. have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the introduced, foreign protein.

[0117] For long-term, high-yield production of recombinant PreF antigens disclosed herein, stable expression systems are typically used. For example, cell lines which stably express a PreF antigen polypeptide are introduced into the host cell using expression vectors which contain viral origins of replication or endogenous expression elements and a selectable marker gene. Following the introduction of the vector, cells are allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. For example, resistant groups or colonies of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type. Host cells transformed with a nucleic acid encoding a PreF antigen are optionally cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. As indicated above, if desired, the host cells can be cultured in serum-free (and/or animal product-free) medium.

[0118] Following transduction of a suitable host cell line and growth of the host cells to an appropriate cell density, the selected promoter is induced by appropriate means (e.g., temperature shift or chemical induction) and cells are cultured for an additional period. Optionally, the medium includes components and/or additives that decrease degradation of expressed proteins by proteinases. For example, the medium used for culturing cells to produce PreF antigen can include a protease inhibitor, such as a chelating agent or small molecule inhibitor (e.g., AZ11557272, AS111793, etc.), to reduce or eliminate undesired cleavage by cellular, or extracellular (e.g., matrix) proteinases.

[0119] The secreted polypeptide product is then recovered from the culture medium. Alternatively, cells can be harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification. Eukaryotic or microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents, or other methods, which are well known to those skilled in the art.

[0120] Expressed PreF antigens can be recovered and purified from recombinant cell cultures by any of a number of methods well known in the art, including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, filtration, ultrafiltration, centrifugation, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography (e.g., using any of the tagging systems noted herein), hydroxylapatite chromatography, and lectin chromatography. Protein refolding steps can be used, as desired, in completing configuration of the mature protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed in the final purification steps. In addition to the references noted above, a variety of purification methods are well known in the art, including, e.g., those set forth in Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; and Bollag *et al.* (1996) Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ; Harris and Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.; Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY; and Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ.

[0121] In one exemplary embodiment, the PreF proteins are recovered from cells according to the following purification scheme. Following introduction of a recombinant nucleic acid encoding the PreF polypeptide into host CHO cells, transiently transfected host cells or expanded stable populations comprising the introduced polynucleotide sequence are grown in medium and under conditions suitable for growth at an acceptable scale for the desired purpose (e.g., as generally described in Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley- Liss, New York and the references cited therein). Typically, the cells are grown in serum-free medium at 37°C and passaged at 2-3 day intervals in shake flasks or in bioreactors. New cultures established from cells expanded in these conditions, are typically carried out in bioreactors in serum-free medium and incubated at 27 °C with pO₂ maintained at 20% for 5 to 7 days in order to produce the preF antigen.

[0122] To recover recombinant PreF antigen, the cell culture is centrifuged and the cell culture supernatant stored at minus 70°C until further use. Following thawing of culture supernatants, the supernatants are diluted 2 x with MilliQ water and adjusted to pH 6.0 with HCl. Diluted supernatant is loaded at 75 cm/h onto a 3 L CM Ceramic HyperD FF resin packed in BPG 140/500 column, equilibrated in 20 mM phosphate pH 6.0. After loading of the sample, equilibration buffer is processed through the column to get back to UV baseline. After washing with 5 column volumes (CV) of 25 mM phosphate pH 7.0 buffer, elution is performed using a 50 mM Phosphate pH 7.0 buffer containing 0.1 M NaCl.

[0123] The CM Hyper D eluate is diluted 3.3 x with 20 mM phosphate, pH 7.0 to be processed onto a 270 ml Hydroxyapatite Type II column (packed in XK 50), equilibrated with 20 mM PO₄ (Na) buffer pH 7.0, at 50 mL/min. After washing the column with the equilibration buffer (~3 CV), elution is performed using a 20 mM PO₄ (Na) pH 7.0 buffer containing 0.5 M NaCl.

[0124] The HA eluate is processed at 15 mL/min (to respect a 10 minutes contact time with the resin), onto a 150 mL Capto Adhere column (packed in XK 26), equilibrated in 20 mM phosphate pH 7.0. After washing with 5 CV of 10 mM phosphate pH 7.0 containing 0.1 M arginine buffer, elution is performed using a 10 mM Phosphate pH 7.0 buffer containing 0.6 M arginine.

[0125] The Capto Adhere eluate is then concentrated approximately 10 x for processing onto a preparative size exclusion chromatography (SEC) column. Concentration is performed using a 50 kD Pellicon polyethersulfone membrane. Before being processed onto the SEC column, the material is filtered through a PLANOVA 20N 100 cm² filter, used as a viral clearance step. This nanofiltration step can be either placed after or before concentration on Pellicon membrane.

[0126] Preparative SEC is then performed using a 500 mL Superdex S200 column and 10 mM phosphate (Na/K₂), 160 mM NaCl, pH 6.5 buffer (corresponding to final buffer) as mobile phase. A volume of concentrated PreF corresponding to 5% of SEC column volume is loaded onto the resin at ~2.6 mL/min. Typically, fractions of 10 mL are collected. Analytical pools of fractions can be analyzed on SDS gel by silver staining and western blot anti HCP (Host cell proteins) if desired to optimize yields while minimizing HCP levels.

[0127] Purified bulk is obtained after filtration on 0.22 µm Millex filters (alternatively a Sterivex filter can be used). If desired the purified PreF antigen preparation can be stored at minus 70°C prior to use.

[0128] Alternatively, PreF proteins can include a polyhistidine (*e.g.*, six histidine) tag, which can be used to facilitate purification. For such histidine tagged PreF polypeptides, the following purification protocol can be employed. Prior to purification using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), the cell culture supernatant is diluted twofold in buffer A (20mM Bicine, pH8,5) and pH is adjusted to 8.5. The resulting solution is loaded on a Q sepharose FF column (GE Healthcare), *e.g.*, of 23 ml of column volume, previously equilibrated with Buffer A. PreF proteins are captured on the column, along with some host cell contaminants. The culture media components that would interfere with the IMAC purification step are not retained and are eliminated in the flow through. The proteins are separated and eluted by a stepwise elution of 200mM, 400mM, 600mM, 800mM and 1M NaCl. PreF proteins of interest are eluted during the first step at 200mM NaCl. Optionally, recovery can be monitored using SDS PAGE and western blotting using an anti His-tag antibody to detect the tagged PreF protein. Fractions can be pooled prior to continuing the purification.

[0129] The (pooled) PreF protein containing eluate is diluted threefold in buffer B (20mM Bicine, 500mM NaCl, pH8,3) and pH is adjusted to 8.3. The resulting solution is loaded

on IMAC sepharose FF resin loaded with Nickel chloride (GE Healthcare) (*e.g.*, of 5 ml of column volume), previously equilibrated with buffer B. PreF are bound to the resin and the majority of host cell contaminants are eluted in the flow through. The column is washed with 20mM Imidazole in order to remove weakly bound contaminants. PreF proteins are eluted by a step elution of 250mM Imidazole. SDS PAGE stained with coomassie blue and western blot anti His-tag can be performed to identify positive fractions.

[0130] The pool from IMAC can then be concentrated to a concentration of at least 150 µg/ml using a centricon concentration device (Millipore) and the protein can be dialysed in PBS buffer supplemented with 500mM L-Arginine. Resulting protein is quantified using RCDC protein assay (BioRad) and stored at -70 or -80°C until use.

[0131]

IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND METHODS

[0132] Also provided are immunogenic compositions including any of the PreF antigens disclosed above (such as those exemplified by SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 18, 20 and 22) and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

[0133] In certain embodiments, typically, embodiments in which the PreF antigen does not include a G protein component (such as SEQ ID NO:6), the immunogenic composition can include an isolated, recombinant and/or purified G protein. Numerous suitable G proteins have been described in the art, and include full length recombinant G proteins and chimeric proteins made up of a portion of the G protein (such as amino acids 128-229 or 130-230) and a fusion partner (such as thioredoxin), or a signal and/or leader sequence, that facilitates expression and/or purification. Exemplary G proteins for use in admixture with a PreF antigen can be found in WO2008114149, US Patent No. 5,149,650, US Patent No. 6,113,911, US Published Application No. 20080300382, and US Patent No. 7,368,537, each of which is incorporated herein by reference. As indicated with respect to the chimeric PreF-G proteins, a smaller fragment of the G protein, such as the portion between amino acids 149-229, or the portion between approximately 128 to approximately 229 can favorably be employed in the context of mixtures involving a PreF (without G) and G. As discussed above, the important consideration is the presence of immunodominant epitopes, *e.g.*, included within the region of amino acids 183-197. Alternatively, a full-length G protein can be employed in such compositions.

[0134] Pharmaceutically acceptable carriers and excipients are well known and can be selected by those of skill in the art. For example, the carrier or excipient can favorably include a buffer. Optionally, the carrier or excipient also contains at least one component that stabilizes solubility and/or stability. Examples of solubilizing/stabilizing agents include detergents, for example, laurel sarcosine and/or tween. Alternative solubilizing/stabilizing agents include arginine, and glass forming polyols (such as sucrose, trehalose and the like). Numerous pharmaceutically acceptable carriers and/or pharmaceutically acceptable excipients are known in the art and are described, *e.g.*, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (975).

[0135] Accordingly, suitable excipients and carriers can be selected by those of skill in the art to produce a formulation suitable for delivery to a subject by a selected route of administration.

[0136] Suitable excipients include, without limitation: glycerol, Polyethylene glycol (PEG), Sorbitol, Trehalose, N-lauroylsarcosine sodium salt, L-proline, Non detergent sulfobetaine, Guanidine hydrochloride, Urea, Trimethylamine oxide, KCl, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and other divalent cation related salts, Dithiothreitol, Dithioerytrol, and β -mercaptoethanol. Other excipients can be detergents (including: Tween80, Tween20, Triton X-00, NP-40, Empigen BB, Octylglucoside, Lauroyl maltoside, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, Sodium deoxycholate, Sodium dodecyl sulphate, Cetyltrimethylammonium bromide).

[0137] Optionally, the immunogenic compositions also include an adjuvant. In the context of an immunogenic composition suitable for administration to a subject for the purpose of eliciting a protective immune response against RSV, the adjuvant is selected to elicit a Th1 biased or Th1/Th2 balanced immune response, characterized by the production of interferon-gamma (IFN- γ).

[0138] The adjuvant is typically selected to enhance a Th1 biased immune response (or a Th1/Th2 balanced immune response), characterized by the production and secretion of IFN- γ , in the subject, or population of subjects, to whom the composition is administered. For example, when the immunogenic composition is to be administered to a subject of a particular age group susceptible to (or at increased risk of) RSV infection, the adjuvant is selected to be safe and effective in the subject or population of subjects. Thus, when

formulating an immunogenic composition containing an RSV PreF antigen for administration in an elderly subject (such as a subject greater than 65 years of age), the adjuvant is selected to be safe and effective in elderly subjects. Similarly, when the immunogenic composition containing the RSV PreF antigen is intended for administration in neonatal or infant subjects (such as subjects between birth and the age of two years), the adjuvant is selected to be safe and effective in neonates and infants. In the case of an adjuvant selected for safety and efficacy in neonates and infants, an adjuvant dose can be selected that is a dilution (e.g., a fractional dose) of a dose typically administered to an adult subject.

[0139] Additionally, the adjuvant is typically selected to enhance a Th1 immune response when administered via a route of administration, by which the immunogenic composition is administered. For example, when formulating an immunogenic composition containing a PreF antigen for nasal administration, proteosome and protollin are favorable Th1-biasing adjuvants. In contrast, when the immunogenic composition is formulated for intramuscular administration, adjuvants including one or more of 3D-MPL, squalene (e.g., QS21), liposomes, and/or oil and water emulsions are favorably selected.

[0140] One suitable adjuvant for use in combination with PreF antigens is a non-toxic bacterial lipopolysaccharide derivative. An example of a suitable non-toxic derivative of lipid A, is monophosphoryl lipid A or more particularly 3-Deacylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL). 3D-MPL is sold under the name MPL by GlaxoSmithKline Biologicals N.A., and is referred throughout the document as MPL or 3D-MPL. See, for example, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 and 4,912,094. 3D-MPL primarily promotes CD4⁺ T cell responses with an IFN- γ (Th1) phenotype. 3D-MPL can be produced according to the methods disclosed in GB2220211 A. Chemically it is a mixture of 3-deacylated monophosphoryl lipid A with 3, 4, 5 or 6 acylated chains. In the compositions of the present invention small particle 3D-MPL can be used. Small particle 3D-MPL has a particle size such that it can be sterile-filtered through a 0.22 μ m filter. Such preparations are described in WO94/21292.

[0141] A lipopolysaccharide, such as 3D-MPL, can be used at amounts between 1 and 50 μ g, per human dose of the immunogenic composition. Such 3D-MPL can be used at a level of about 25 μ g, for example between 20-30 μ g, suitably between 21-29 μ g or between 22 and 28 μ g or between 23 and 27 μ g or between 24 and 26 μ g, or 25 μ g. In another

embodiment, the human dose of the immunogenic composition comprises 3D-MPL at a level of about 10 μ g, for example between 5 and 15 μ g, suitably between 6 and 14 μ g, for example between 7 and 13 μ g or between 8 and 12 μ g or between 9 and 11 μ g, or 10 μ g. In a further embodiment, the human dose of the immunogenic composition comprises 3D-MPL at a level of about 5 μ g, for example between 1 and 9 μ g, or between 2 and 8 μ g or suitably between 3 and 7 μ g or 4 and μ g, or 5 μ g.

[0142] In other embodiments, the lipopolysaccharide can be a β (1-6) glucosamine disaccharide, as described in US Patent No. 6,005,099 and EP Patent No. 0 729 473 B1. One of skill in the art would be readily able to produce various lipopolysaccharides, such as 3D-MPL, based on the teachings of these references. Nonetheless, each of these references is incorporated herein by reference. In addition to the aforementioned immunostimulants (that are similar in structure to that of LPS or MPL or 3D-MPL), acylated monosaccharide and disaccharide derivatives that are a sub-portion to the above structure of MPL are also suitable adjuvants. In other embodiments, the adjuvant is a synthetic derivative of lipid A, some of which are described as TLR-4 agonists, and include, but are not limited to: OM174 (2-deoxy-6-o-[2-deoxy-2-[(R)-3-dodecanoyloxytetra-decanoylamino]-4-o-phosphono- β -D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino]- α -D-glucopyranosyldihydrogenphosphate), (WO 95/14026); OM 294 DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoyloxytetradecanoylamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihydrogenophosphate) (WO 99/64301 and WO 00/0462); and OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R) -3-[(R) -dodecanoyloxytetradecanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino]decan-1,10-diol,1 -dihydrogenophosphate 10-(6-aminohexanoate) (WO 01/46127).

[0143] Other TLR4 ligands which can be used are alkyl Glucosaminide phosphates (AGPs) such as those disclosed in WO 98/50399 or US Patent No. 6,303,347 (processes for preparation of AGPs are also disclosed), suitably RC527 or RC529 or pharmaceutically acceptable salts of AGPs as disclosed in US Patent No. 6,764,840. Some AGPs are TLR4 agonists, and some are TLR4 antagonists. Both are thought to be useful as adjuvants.

[0144] Other suitable TLR-4 ligands, capable of causing a signaling response through TLR-4 (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5) are, for example, lipopolysaccharide from gram-

negative bacteria and its derivatives, or fragments thereof, in particular a non-toxic derivative of LPS (such as 3D-MPL). Other suitable TLR agonists are: heat shock protein (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 or 90; surfactant Protein A, hyaluronan oligosaccharides, heparan sulphate fragments, fibronectin fragments, fibrinogen peptides and b-defensin-2, and muramyl dipeptide (MDP). In one embodiment the TLR agonist is HSP 60, 70 or 90. Other suitable TLR-4 ligands are as described in WO 2003/011223 and in WO 2003/099195, such as compound I, compound II and compound III disclosed on pages 4-5 of WO2003/011223 or on pages 3-4 of WO2003/099195 and in particular those compounds disclosed in WO2003/011223 as ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, and ER804764. For example, one suitable TLR-4 ligand is ER804057.

[0145] Additional TLR agonists are also useful as adjuvants. The term "TLR agonist" refers to an agent that is capable of causing a signaling response through a TLR signaling pathway, either as a direct ligand or indirectly through generation of endogenous or exogenous ligand. Such natural or synthetic TLR agonists can be used as alternative or additional adjuvants. A brief review of the role of TLRs as adjuvant receptors is provided in Kaisho & Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589:1-13, 2002. These potential adjuvants include, but are not limited to agonists for TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9. Accordingly, in one embodiment, the adjuvant and immunogenic composition further comprises an adjuvant which is selected from the group consisting of: a TLR-1 agonist, a TLR-2 agonist, TLR-3 agonist, a TLR-4 agonist, TLR-5 agonist, a TLR-6 agonist, TLR-7 agonist, a TLR-8 agonist, TLR-9 agonist, or a combination thereof.

[0146] In one embodiment of the present invention, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-1. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-1 is selected from: Tri-acylated lipopeptides (LPs); phenol-soluble modulin; Mycobacterium tuberculosis LP; S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, trihydrochloride (Pam3Cys) LP which mimics the acetylated amino terminus of a bacterial lipoprotein and OspA LP from *Borrelia burgdorferi*.

[0147] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-2. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-2 is one or more of a lipoprotein, a peptidoglycan, a bacterial lipopeptide from *M tuberculosis*, *B burgdorferi* or *T pallidum*; peptidoglycans

from species including *Staphylococcus aureus*; lipoteichoic acids, mannuronic acids, Neisseria porins, bacterial fimbriae, Yersinia virulence factors, CMV virions, measles haemagglutinin, and zymosan from yeast.

[0148] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-3. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-3 is double stranded RNA (dsRNA), or polyinosinic-polycytidylic acid (Poly IC), a molecular nucleic acid pattern associated with viral infection.

[0149] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-5. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-5 is bacterial flagellin.

[0150] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-6. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-6 is mycobacterial lipoprotein, di-acylated LP, and phenol-soluble modulin. Additional TLR6 agonists are described in WO 2003/043572.

[0151] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-7. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-7 is a single stranded RNA (ssRNA), loxoribine, a guanosine analogue at positions N7 and C8, or an imidazoquinoline compound, or derivative thereof. In one embodiment, the TLR agonist is imiquimod. Further TLR7 agonists are described in WO 2002/085905.

[0152] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-8. Suitably, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-8 is a single stranded RNA (ssRNA), an imidazoquinoline molecule with anti-viral activity, for example resiquimod (R848); resiquimod is also capable of recognition by TLR-7. Other TLR-8 agonists which can be used include those described in WO 2004/071459.

[0153] In an alternative embodiment, a TLR agonist is used that is capable of causing a signaling response through TLR-9. In one embodiment, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-9 is HSP90. Alternatively, the TLR agonist capable of causing a signaling response through TLR-9 is bacterial or viral DNA, DNA containing unmethylated CpG nucleotides, in particular sequence contexts known as CpG

motifs. CpG-containing oligonucleotides induce a predominantly Th1 response. Such oligonucleotides are well known and are described, for example, in WO 96/02555, WO 99/33488 and U.S. Patent Nos. 6,008,200 and 5,856,462. Suitably, CpG nucleotides are CpG oligonucleotides. Suitable oligonucleotides for use in the immunogenic compositions of the present invention are CpG containing oligonucleotides, optionally containing two or more dinucleotide CpG motifs separated by at least three, suitably at least six or more nucleotides. A CpG motif is a Cytosine nucleotide followed by a Guanine nucleotide. The CpG oligonucleotides of the present invention are typically deoxynucleotides. In a specific embodiment the internucleotide in the oligonucleotide is phosphorodithioate, or suitably a phosphorothioate bond, although phosphodiester and other internucleotide bonds are within the scope of the invention. Also included within the scope of the invention are oligonucleotides with mixed internucleotide linkages. Methods for producing phosphorothioate oligonucleotides or phosphorodithioate are described in US Patent Nos. 5,666,153, 5,278,302 and WO 95/26204.

[0154] Other adjuvants that can be used in immunogenic compositions with a PreF antigens, *e.g.*, on their own or in combination with 3D-MPL, or another adjuvant described herein, are saponins, such as QS21.

[0155] Saponins are taught in: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Saponins are steroid or triterpene glycosides widely distributed in the plant and marine animal kingdoms. Saponins are noted for forming colloidal solutions in water which foam on shaking, and for precipitating cholesterol. When saponins are near cell membranes they create pore-like structures in the membrane which cause the membrane to burst. Haemolysis of erythrocytes is an example of this phenomenon, which is a property of certain, but not all, saponins.

[0156] Saponins are known as adjuvants in vaccines for systemic administration. The adjuvant and haemolytic activity of individual saponins has been extensively studied in the art (Lacaille-Dubois and Wagner, *supra*). For example, Quil A (derived from the bark of the South American tree *Quillaja Saponaria* Molina), and fractions thereof, are described in US 5,057,540 and "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55; and EP 0 362 279 B1. Particulate structures, termed Immune Stimulating Complexes (ISCOMS), comprising fractions of Quil A are haemolytic and have been used in the manufacture of vaccines (Morcin, B., EP 0 109 942

B1; WO 96/11711; WO 96/33739). The haemolytic saponins QS21 and QS17 (HPLC purified fractions of Quil A) have been described as potent systemic adjuvants, and the method of their production is disclosed in US Patent No. 5,057,540 and EP 0 362 279 B1, which are incorporated herein by reference. Other saponins which have been used in systemic vaccination studies include those derived from other plant species such as *Gypsophila* and *Saponaria* (Bomford *et al.*, Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

[0157] QS21 is an Hplc purified non-toxic fraction derived from the bark of *Quillaja Saponaria* Molina. A method for producing QS21 is disclosed in US Patent No. 5,057,540. Non-reactogenic adjuvant formulations containing QS21 are described in WO 96/33739. The aforementioned references are incorporated by reference herein. Said immunologically active saponin, such as QS21, can be used in amounts of between 1 and 50 µg, per human dose of the immunogenic composition. Advantageously QS21 is used at a level of about 25 µg, for example between 20–30 µg, suitably between 21–29 µg or between 22–28 µg or between 23–27 µg or between 24–26 µg, or 25 µg. In another embodiment, the human dose of the immunogenic composition comprises QS21 at a level of about 10 µg, for example between 5 and 15 µg, suitably between 6–14 µg, for example between 7–13 µg or between 8–12 µg or between 9–11 µg, or 10 µg. In a further embodiment, the human dose of the immunogenic composition comprises QS21 at a level of about 5 µg, for example between 1–9 µg, or between 2–8 µg or suitably between 3–7 µg or 4–6 µg, or 5 µg. Such formulations comprising QS21 and cholesterol have been shown to be successful Th1 stimulating adjuvants when formulated together with an antigen. Thus, for example, PreF polypeptides can favorably be employed in immunogenic compositions with an adjuvant comprising a combination of QS21 and cholesterol.

[0158] Optionally, the adjuvant can also include mineral salts such as an aluminium or calcium salts, in particular aluminium hydroxide, aluminium phosphate and calcium phosphate. For example, an adjuvant containing 3D-MPL in combination with an aluminium salt (*e.g.*, aluminium hydroxide or “alum”) is suitable for formulation in an immunogenic composition containing a PreF antigen for administration to a human subject.

[0159] Another class of suitable Th1 biasing adjuvants for use in formulations with PreF antigens includes OMP-based immunostimulatory compositions. OMP-based immunostimulatory compositions are particularly suitable as mucosal adjuvants, *e.g.*, for intranasal administration. OMP-based immunostimulatory compositions are a genus of

preparations of outer membrane proteins (OMPs, including some porins) from Gram-negative bacteria, such as, but not limited to, *Neisseria* species (see, e.g., Lowell *et al.*, J. Exp. Med. 167:658, 1988; Lowell *et al.*, Science 240:800, 1988; Lynch *et al.*, Biophys. J. 45:104, 1984; Lowell, in "New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, page 193, 1997; U.S. Pat. No. 5,726,292; U.S. Pat. No. 4,707,543), which are useful as a carrier or in compositions for immunogens, such as bacterial or viral antigens. Some OMP-based immunostimulatory compositions can be referred to as "Proteosomes," which are hydrophobic and safe for human use.

Proteosomes have the capability to auto-assemble into vesicle or vesicle-like OMP clusters of about 20 nm to about 800 nm, and to noncovalently incorporate, coordinate, associate (e.g., electrostatically or hydrophobically), or otherwise cooperate with protein antigens (Ags), particularly antigens that have a hydrophobic moiety. Any preparation method that results in the outer membrane protein component in vesicular or vesicle-like form, including multi-molecular membranous structures or molten globular-like OMP compositions of one or more OMPs, is included within the definition of Proteosome. Proteosomes can be prepared, for example, as described in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,726,292 or U.S. Pat. No. 5,985,284). Proteosomes can also contain an endogenous lipopolysaccharide or lipooligosaccharide (LPS or LOS, respectively) originating from the bacteria used to produce the OMP porins (e.g., *Neisseria* species), which generally will be less than 2% of the total OMP preparation.

[0160] Proteosomes are composed primarily of chemically extracted outer membrane proteins (OMPs) from *Neisseria meningitidis* (mostly porins A and B as well as class 4 OMP), maintained in solution by detergent (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Proteosomes can be formulated with a variety of antigens such as purified or recombinant proteins derived from viral sources, including the PreF polypeptides disclosed herein, e.g., by diafiltration or traditional dialysis processes. The gradual removal of detergent allows the formation of particulate hydrophobic complexes of approximately 100-200nm in diameter (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

[0161] "Proteosome: LPS or Protollin" as used herein refers to preparations of proteosomes admixed, *e.g.*, by the exogenous addition, with at least one kind of lipo-polysaccharide to provide an OMP-LPS composition (which can function as an immunostimulatory composition). Thus, the OMP-LPS composition can be comprised of two of the basic components of Protollin, which include (1) an outer membrane protein preparation of Proteosomes (*e.g.*, Projuvant) prepared from Gram-negative bacteria, such as *Neisseria meningitidis*, and (2) a preparation of one or more liposaccharides. A lipo-oligosaccharide can be endogenous (*e.g.*, naturally contained with the OMP Proteosome preparation), can be admixed or combined with an OMP preparation from an exogenously prepared lipo-oligosaccharide (*e.g.*, prepared from a different culture or microorganism than the OMP preparation), or can be a combination thereof. Such exogenously added LPS can be from the same Gram-negative bacterium from which the OMP preparation was made or from a different Gram-negative bacterium. Protollin should also be understood to optionally include lipids, glycolipids, glycoproteins, small molecules, or the like, and combinations thereof. The Protollin can be prepared, for example, as described in U.S. Patent Application Publication No. 2003/0044425.

[0162] Combinations of different adjuvants, such as those mentioned hereinabove, can also be used in compositions with PreF antigens. For example, as already noted, QS21 can be formulated together with 3D-MPL. The ratio of QS21 : 3D-MPL will typically be in the order of 1 : 10 to 10 : 1; such as 1:5 to 5 : 1, and often substantially 1 : 1. Typically, the ratio is in the range of 2.5 : 1 to 1 : 1 3D-MPL: QS21. Another combination adjuvant formulation includes 3D-MPL and an aluminium salt, such as aluminium hydroxide. When formulated in combination, this combination can enhance an antigen-specific Th1 immune response.

[0163] In some instances, the adjuvant formulation a mineral salt, such as a calcium or aluminium (alum) salt, for example calcium phosphate, aluminium phosphate or aluminium hydroxide. Where alum is present, *e.g.*, in combination with 3D-MPL, the amount is typically between about 100µg and 1mg, such as from about 100µg, or about 200µg to about 750µg, such as about 500µg per dose.

[0164] In some embodiments, the adjuvant includes an oil and water emulsion, *e.g.*, an oil-in-water emulsion. One example of an oil-in-water emulsion comprises a metabolisable oil, such as squalene, a tocol such as a tocopherol, *e.g.*, alpha-tocopherol, and a surfactant, such as sorbitan trioleate (Span 85™) or polyoxyethylene sorbitan

monooleate (Tween 80™), in an aqueous carrier. In certain embodiments, the oil-in-water emulsion does not contain any additional immunostimulants(s), (in particular it does not contain a non-toxic lipid A derivative, such as 3D-MPL, or a saponin, such as QS21). The aqueous carrier can be, for example, phosphate buffered saline. Additionally the oil-in-water emulsion can contain span 85 and/or lecithin and/or tricaprylin.

[0165] In another embodiment of the invention there is provided a vaccine composition comprising an antigen or antigen composition and an adjuvant composition comprising an oil-in-water emulsion and optionally one or more further immunostimulants, wherein said oil-in-water emulsion comprises 0.5-10 mg metabolisable oil (suitably squalene), 0.5-11 mg tocol (suitably a tocopherol, such as alpha-tocopherol) and 0.4-4 mg emulsifying agent.

[0166] In one specific embodiment, the adjuvant formulation includes 3D-MPL prepared in the form of an emulsion, such as an oil-in-water emulsion. In some cases, the emulsion has a small particle size of less than 0.2µm in diameter, as disclosed in WO 94/21292. For example, the particles of 3D-MPL can be small enough to be sterile filtered through a 0.22micron membrane (as described in European Patent number 0 689 454). Alternatively, the 3D-MPL can be prepared in a liposomal formulation. Optionally, the adjuvant containing 3D-MPL (or a derivative thereof) also includes an additional immunostimulatory component.

[0167] The adjuvant is selected to be safe and effective in the population to which the immunogenic composition is administered. For adult and elderly populations, the formulations typically include more of an adjuvant component than is typically found in an infant formulation. In particular formulations using an oil-in-water emulsion, such an emulsion can include additional components, for example, such as cholesterol, squalene, alpha tocopherol, and/or a detergent, such as tween 80 or span85. In exemplary formulations, such components can be present in the following amounts: from about 1-50mg cholesterol, from 2 to 10% squalene, from 2 to 10% alpha tocopherol and from 0.3 to 3% tween 80. Typically, the ratio of squalene: alpha tocopherol is equal to or less than 1 as this provides a more stable emulsion. In some cases, the formulation can also contain a stabilizer.

[0168] When an immunogenic composition with a PreF polypeptide antigen is formulated for administration to an infant, the dosage of adjuvant is determined to be effective and

relatively non-reactogenic in an infant subject. Generally, the dosage of adjuvant in an infant formulation is lower (for example, the dose may be a fraction of the dose provided in a formulation to be administered to adults) than that used in formulations designed for administration to adult (e.g., adults aged 65 or older). For example, the amount of 3D-MPL is typically in the range of 1 µg-200 µg, such as 10-100 µg, or 10 µg-50 µg per dose. An infant dose is typically at the lower end of this range, e.g., from about 1 µg to about 50 µg, such as from about 2 µg, or about 5 µg, or about 10 µg, to about 25 µg, or to about 50 µg. Typically, where QS21 is used in the formulation, the ranges are comparable (and according to the ratios indicated above). In the case of an oil and water emulsion (e.g., an oil-in-water emulsion), the dose of adjuvant provided to a child or infant can be a fraction of the dose administered to an adult subject. A demonstration of the efficacy of immunogenic compositions containing a PreF antigen in combination various doses of an exemplary oil-in-water adjuvant is provided in Example 9.

[0169] An immunogenic composition typically contains an immunoprotective quantity (or a fractional dose thereof) of the antigen and can be prepared by conventional techniques. Preparation of immunogenic compositions, including those for administration to human subjects, is generally described in *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Encapsulation within liposomes is described, for example, by Fullerton, U.S. Patent 4,235,877. Conjugation of proteins to macromolecules is disclosed, for example, by Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor *et al.*, U.S. Patent 4,474,757.

[0170] Typically, the amount of protein in each dose of the immunogenic composition is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in the typical subject. Immunoprotective in this context does not necessarily mean completely protective against infection; it means protection against symptoms or disease, especially severe disease associated with the virus. The amount of antigen can vary depending upon which specific immunogen is employed. Generally, it is expected that each human dose will comprise 1-1000 µg of protein, such as from about 1 µg to about 100 µg, for example, from about 1 µg to about 50 µg, such as about 1 µg, about 2 µg, about 5 µg, about 10 µg, about 15 µg, about 20 µg, about 25 µg, about 30 µg, about

40µg, or about 50µg. The amount utilized in an immunogenic composition is selected based on the subject population (*e.g.*, infant or elderly). An optimal amount for a particular composition can be ascertained by standard studies involving observation of antibody titres and other responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive a boost in about 4 weeks.

[0171] It should be noted that regardless of the adjuvant selected, the concentration in the final formulation is calculated to be safe and effective in the target population. For example, immunogenic compositions for eliciting an immune response against RSV in humans are favorably administered to infants (*e.g.*, infants between birth and 1 year, such as between 0 and 6 months, at the age of initial dose). Immunogenic compositions for eliciting an immune response against RSV are also favorably administered to elderly humans (*e.g.*, alone or in a combination with antigens of other pathogens associated with COPD). It will be appreciated that the choice of adjuvant can be different in these different applications, and the optimal adjuvant and concentration for each situation can be determined empirically by those of skill in the art.

[0172] In certain embodiments, the immunogenic compositions are vaccines that reduce or prevent infection with RSV. In some embodiments, the immunogenic compositions are vaccines that reduce or prevent a pathological response following infection with RSV. Optionally, the immunogenic compositions containing a PreF antigen are formulated with at least one additional antigen of a pathogenic organism other than RSV. For example, the pathogenic organism can be a pathogen of the respiratory tract (such as a virus or bacterium that causes a respiratory infection). In certain cases, the immunogenic composition contains an antigen derived from a pathogenic virus other than RSV, such as a virus that causes an infection of the respiratory tract, such as influenza or parainfluenza. In other embodiments, the additional antigens are selected to facilitate administration or reduce the number of inoculations required to protect a subject against a plurality of infectious organisms. For example, the antigen can be derived from any one or more of influenza, hepatitis B, diphtheria, tetanus, pertussis, *Hemophilus influenza*, poliovirus, *Streptococcus* or *Pneumococcus*, among others.

[0173] Accordingly, the use of PreF antigens or nucleic acids that encode them in the preparation of a medicament for treating (either therapeutically following or prophylactically prior to) exposure to or infection by RSV is also a feature of this

disclosure. Likewise, methods for eliciting an immune response against RSV in a subject are a feature of this disclosure. Such methods include administering an immunologically effective amount of a composition comprising a PreF antigen to a subject, such as a human subject. Commonly, the composition includes an adjuvant that elicits a Th1 biased immune response. The composition is formulated to elicit an immune response specific for RSV without enhancing viral disease following contact with RSV. That is, the composition is formulated to and results in a Th1 biased immune response that reduces or prevents infection with a RSV and/or reduces or prevents a pathological response following infection with a RSV. Although the composition can be administered by a variety of different routes, most commonly, the immunogenic compositions are delivered by an intramuscular or intranasal route of administration.

[0174] An immunogenic composition typically contains an immunoprotective quantity (or a fractional dose thereof) of the antigen and can be prepared by conventional techniques. Preparation of immunogenic compositions, including those for administration to human subjects, is generally described in *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Encapsulation within liposomes is described, for example, by Fullerton, U.S. Patent 4,235,877. Conjugation of proteins to macromolecules is disclosed, for example, by Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor *et al.*, U.S. Patent 4,474,757.

[0175] Typically, the amount of protein in each dose of the immunogenic composition is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in the typical subject. Immunoprotective in this context does not necessarily mean completely protective against infection; it means protection against symptoms or disease, especially severe disease associated with the virus. The amount of antigen can vary depending upon which specific immunogen is employed. Generally, it is expected that each human dose will comprise 1-1000µg of protein, such as from about 1µg to about 100µg, for example, from about 1µg to about 50µg, such as about 1µg, about 2µg, about 5µg, about 10µg, about 15µg, about 20µg, about 25µg, about 30µg, about 40µg, or about 50µg. The amount utilized in an immunogenic composition is selected based on the subject population (*e.g.*, infant or elderly). An optimal amount for a

particular composition can be ascertained by standard studies involving observation of antibody titres and other responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive a boost in about 4-12 weeks. For example, when administering an immunogenic composition containing a PreF antigen to an infant subject, the initial and subsequent inoculations can be administered to coincide with other vaccines administered during this period.

[0176] The following examples are provided to illustrate certain particular features and/or embodiments. These examples should not be construed to limit the invention to the particular features or embodiments described.

EXAMPLES

Example 1: Exemplary PreF antigens

[0177] The PreF antigen was modified as compared to a native RSV F protein in order to stabilize the protein in its prefusion conformation, based on the prediction that an immune response generated to the prefusion conformation of F would preferentially include antibodies that would prevent binding, conformation shifting and/or other events involved in membrane fusion, thereby increasing the efficacy of the protective response.

[0178] FIG. 1A and B schematically illustrate features of RSV F0 and exemplary PreF recombinant antigens. FIG. 1A is a representation of the RSV F0 protein. F0 is a pre-protein consisting of 574 amino acids. The F0 pre-protein is proteolytically processed and glycosylated following translation. A signal peptide, which is later removed by a signal peptidase, targets translation of the F0 pre-protein to the reticulum endoplasmic (RE). Nascent peptide in the RE is then N-glycosylated at multiple sites (represented by triangles). Furin cleavage of F0 generates F2 and F1 peptide domains, which are folded and assembled together as a trimer of F2-F1 heterodimers (that is, 3 times F2-F1). In its native state, the F protein is anchored to the membrane by a transmembrane helix in the C-terminal region. Additional features of the F0 polypeptide include, 15 Cysteine residues, 4 characterized neutralizing epitopes, 2 coiled-coil regions, and a lipidation motif. FIG. 1B illustrates features of exemplary PreF antigens. To construct the PreF antigen, the F0 polypeptide was modified to stabilize the prefusion conformation of the F protein, thereby retaining the predominant immunogenic epitopes of the F protein as presented by the RSV virus prior to binding to and fusion with host cells. The following stabilizing mutations were introduced into the PreF antigen relative to the F0 polypeptide. First, a stabilizing coiled-coil domain was placed at the C-terminal end of the extracellular domain of the F0 polypeptide, replacing the membrane anchoring domain of F0. Second, the pep27 peptide (situated between the F2 and F1 domains in the native protein) was removed. Third, both furin motifs were eliminated. In alternative embodiments (designated PreF_V1 and PreF_V2), an immunologically active portion (e.g., amino acids 149-229) of the RSV G protein was added to the C-terminal domain.

[0179] In other embodiments, modifications were introduced to alter (increase or decrease) glycosylation and/or to reduce cleavage by a protease other than furin.

Example 2: Production and Purification of PreF recombinant protein from CHO cells.

[0180] A recombinant polynucleotide sequence encoding an exemplary PreF antigen was introduced into host CHO cells for the production of PreF antigen. Transiently transfected host cells or expanded stable populations comprising the introduced polynucleotide sequence were grown in medium and under conditions suitable for growth at an acceptable scale for the desired purpose (e.g., as generally described in Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley- Liss, New York and the references cited therein). Typically, the cells were grown in serum-free medium in shake flasks at 37°C with 5% CO₂ and passaged at 2-3 day intervals, or in bioreactors at 29°C with pO₂ maintained at 20%.

[0181] To recover recombinant PreF antigen, the cell culture was centrifuged and the cell culture supernatant stored at about -80°C until further use. For further analysis, two liter aliquots of cell culture supernatant were diluted 2x with purified water and adjusted to pH 9.5 with NaOH. The supernatant was loaded at a rate of 14 ml/min. onto a Q Sepharose FF ion exchange column (60 ml, 11.3 cm), equilibrated in 20 mM piperazine pH 9.5. After washing the column with the starting buffer, elution was performed with a NaCl gradient from 0 to 0.5 M NaCl in 20 column volumes (fraction size 10 ml). Fractions were analyzed on SDS PAGE gel by silver staining and western blot. Fractions containing substantial PreF protein were then pooled prior to further processing.

[0182] The pooled elution of the Q step (~130 mls) was subjected to buffer exchange into 10 mM phosphate, pH 7.0 using the bench-scale TFF system from Millipore with the Pellicon XL PES Biomax 100 (MWCO 10,000 Da) membrane cassette. The resulting material had a pH of 7.0 and a conductivity of 1.8 mS/cm. 100 ml of this sample was loaded at 5 ml/min. on a 10 ml Hydroxy apatite Type II (HA TII) gel (XK 16, height=5cm) equilibrated with 10 mM PO₄ (Na) buffer pH 7.0. After washing the column with the starting buffer, elution was performed with a gradient from 10 mM to 200 mM PO₄ (Na) pH 7.0 in 20 column volumes. Fractions were again analysed on SDS PAGE with silver staining and coomassie blue, and the positive fractions were pooled.

[0183] Following affinity chromatography, the pooled fractions were concentrated and the buffer exchanged into DPBS (pH ~7.4) using a Vivaspin 20 concentrator unit, 10,000 Da MWCO. The final product was about 13 ml. Protein concentration was 195 µg/ml,

assessed by Lowry assay. Purity was greater than 95%. This purified PreF antigen preparation was filter sterilized and stored at -20°C prior to use.

Example 3: Characterization of the PreF recombinant protein produced in CHO cells.

[0184] PreF recombinant protein produced in CHO cells was characterized by asymmetrical field flow fractionation (AFF-MALS) and compared to a chimeric antigen including RSV F and G protein components. AFF-MALS allows separation of protein species according to their molecular size in a liquid flow with minimal matrix interaction and further analysis by multi-angle light scattering for accurate molecular weight determination. FIG. 2A shows that more than 65% of purified FG material is found as high molecular weight oligomers (1000–100 000 KDa) in its final PBS buffer while 3% remain in monomeric form.

[0185] FIG. 2B shows that the purified PreF protein is folded in its trimeric form to a proportion of 73% in PBS buffer. 10% of the material is found as 1000 to 20 000 KDa oligomers. These results indicate that the recombinant PreF protein expressed in CHO cells is folded as a trimer as predicted for the native state.

[0186] Purified PreF protein was also crosslinked with glutaraldehyde for the double purpose of confirming the soluble nature of the protein in phosphate buffer solution and of generating aggregates for comparative in vivo evaluation with FG protein (see Example 7 below). Glutaraldehyde crosslinking is known for providing a good assessment of the quaternary structure of a protein, and is described in (*Biochemistry*, 36:10230-10239 (1997); *Eur. J. Biochem.*, 271:4284-4292 (2004)).

[0187] Protein was incubated with 1%, 2% and 5% of glutaraldehyde crosslinking agent for four hours at 4°C and the reaction was blocked by addition of NaBH₄. Excess glutaraldehyde was removed by column desalting in PBS buffer. Resulting protein was quantified by absorbance at 280nm and evaluated by SDS PAGE in denaturing and reducing condition. The majority of purified recombinant PreF was determined to migrate as a trimer in PBS solution. Increasing the incubation temperature to 23°C was required to convert majority of trimeric protein to high molecular weight aggregates, as confirmed by SDS PAGE.

Example 4: *In vitro* Neutralization Inhibition by the PreF antigen

[0188] Human sera obtained from volunteers were screened for reactivity against RSV A by ELISA and used in the neutralization inhibition (NI) assay at relevant dilution based on prior RSV neutralization potential titration established for each serum sample. Briefly, Sera were mixed with inhibitor proteins (PreF or a control protein corresponding essentially to the chimeric FG disclosed in US Patent No. 5,194,595, designated RixFG) at concentrations of 25 µg/ml in DMEM with 50% 199-H medium, with 0.5% FBS, 2 mM glutamine, 50 µg/ml genamycin (all Invitrogen), and incubated 1.5 to 2 hours at 37°C on a rotating wheel. 20 µl the serial dilutions of sera and proteins were mixed in a round bottom 96-well plate with a RSV A titred to optimize the range of inhibition for each serum sample. The resulting mixtures were incubated for 20 minutes at 33°C under 5% CO₂ to maintain pH.

[0189] The sera-inhibitor-virus mixtures were then placed into previously Vero cell-seeded flat bottom 96-well plates and incubated for 2 hours at 33°C prior to addition of 160 µl of medium. The plates were further incubated for 5-6 days at 33°C with 5% CO₂ until immunofluorescence assay for NI titer detection. Following fixation for 1 hour with 1% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), plates were blocked with 2% milk/PBS and Block biffer. Goat anti-RSV antibody (Biodesign Internation; 1:400) was added to each well without rinsing and incubated for 2 hours at room temperature (RT). Samples were washed 2x with PBS and anti-goat IgG-FITC (Sigma; 1:400) in blocking buffer was added to the wells. The plates were again incubated for 2 hours at RT and washed 2x as above prior to reading. A well was considered positive when ≥ 1 fluorescent syncytium was detected. The 50% tissue cultue infective dose (TCID₅₀) calculations were performed using the Spearman-Kärber (SK) method and percentages of NI calculated as follow: [(Neut titer of 0 µg/ml inhibitor – Neut titer of 25 µg/ml inhibitor)/Neut titer of 0 µg/ml inhibitor] X 100. Exemplary results shown in FIG. 3 indicate that PreF is superior to FG in NI in 16/21 donors tested.

Example 5: PreF antigen is immunogenic

[0190] To demonstrate immunogenicity of the PreF antigen, mice were immunized twice IM at two weeks interval with preF (6.5, 3.1, 0.63, 0.13, and 0.025 µg/ml) and a Th1 adjuvant containing 3D MPL and QS21 at 1/20 of human dose ("AS01E") or preF (1, 0.2

and 0.04 µg/ml) and a Th1 adjuvant containing 3D MPL and alum 1/10 of human dose ("AS04C") and serum was collected three weeks later.

[0191] Antigen-specific IgG antibody titers were determined on pooled serum samples by ELISA according to standard procedures. Briefly, 96-well plates were coated with purified inactivated RSV A, RSV B and homologous preF protein and incubated overnight at 4°C. Serum samples were serially diluted in blocking buffer starting at an initial concentration of 1:50, along with purified mouse IgG (Sigma, ON) at starting concentrations of 200 ng/ml and incubated for 2h at room temperature. Bound antibody was detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, ON). 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, BD Opt EIATM, BD Biosciences, ON) was used as the substrate for HRP. 50µl of 1M H₂SO₄ was added to each well to stop the reaction. Absorbance values for each well were detected at 450 nm with a Molecular Devices microplate reader (Molecular Devices, USA).

[0192] Representative results detailed in FIGS. 4A and 4B show that strong titers are elicited against both RSV A and RSV B following immunization with preF antigen.

Example 6: PreF elicits neutralizing antibodies

[0193] The presence and quantity of neutralizing antibodies was assessed in serum samples of mice immunized as described above in Example 5. Pooled sera from immunized animals were serially diluted from a starting dilution of 1:8 in RSV medium in 96-well plates (20 µl/well). Control wells contained RSV medium only, or goat anti-RSV antibody at 1:50 (Bioscience international). 500-1000 infectious doses of a representative RSV A or B strain were added to the wells, and the plates were incubated for 20 minutes at 33°C, 5% CO₂, before the mixture was transferred to 96-well flat-bottomed plates previously seeded with 1x10⁵ cells/mL Vero cells. Cells were incubated for approximately 2 hours at 33°C, 5% CO₂ and refed, prior to incubation for 5-6 days at the same temperature. Supernatants were removed; plates were washed with PBS and adhering cells fixed with 1% paraformaldehyde in PBS for 1 hour, followed by indirect immunofluorescence (IFA) using a goat anti RSV primary antibody and anti-goat IgG-FITC for detection.

[0194] Representative results shown in FIGS 5A and 5B, respectively, demonstrate that significant neutralizing antibodies against both RSV strains are detected in sera of animals immunized with preF.

Example 7: PreF protects against RSV challenge

[0195] Mice were immunized twice IM at a two week interval as described above, and challenged three weeks after the second injection with RSV A. Protection against RSV was evaluated by measuring the virus present in lungs following challenge. In brief, lungs from immunized animals were aseptically removed following euthanasia and washed in RSV medium using 2 volumes of 10 ml/lung in 15 ml tubes. Lungs were then weighed and homogenized individually in RSV medium with an automated Potter homogenizer (Fisher, Napan ON), and centrifuged at 2655 x g for 2 minutes at 4°C. The virus present in the supernatants was titered by serial dilution (eight replicates starting at 1:10) on a previously seeded Vero cell (ATCC# CCL-81) monolayer in 96-well plates and incubated for 6 days. RSV was detected by indirect IFA following fixing in 1% paraformaldehyde/PBS pH7.2, with goat anti-RSV primary antibody and FITC labeled anti-goat IgG secondary antibody.

[0196] Representative results shown in FIGS. 6A and B demonstrate that doses equal to or higher than 0.04µg when given in presence of adjuvant elicit strong protection against RSV.

Example 8: PreF does not induce pulmonary eosinophil recruitment following challenge

[0197] To assess the potential of the PreF antigen to provoke exacerbated disease following immunization and subsequent challenge, groups of mice (5 mice/group) were immunized twice each with (a) 10 µg glutaraldehyde-treated preF, (b) 10 µg preF or (c) 10 µg FG without adjuvant. Mice were challenged with RSV A 3 weeks post-boost and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 4 days post challenge. Total leukocyte infiltrates in BAL were enumerated per mouse as well as differential enumerations (300 cells) based on cell morphology of macrophages/monocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes.

[0198] Total cell numbers were multiplied by differential percentages of eosinophils for each animal. Represented are geometric means per group with 95% confidence limits. Representative results shown in FIG. 7 demonstrate that eosinophils are not recruited to the lungs following immunization with preF and challenge. Furthermore, these results suggest that the soluble nature of the preF antigen, as compared to a deliberately aggregated form of preF (glutaraldehyde treatment) or FG antigen (naturally aggregated) does not favour eosinophils.

Example 9: Immunogenicity of PreF antigen formulated with dilutions of an oil-in-water emulsion adjuvant.

[0199] Mice received 250ng preF formulated with the exemplary oil-in-water adjuvant, AS03A, at a 1/10 of the human "full" dose (AS03A) of 10.70 mg squalene, 11.88 mg DL- α -tocopherol, 4.85 mg polysorbate 80, 1/2 dose (AS03B), 1/4 dose (AS03C), or no adjuvant. Control mice received AS03A alone or PBS. The mice were immunized on days 0 and 14. Blood, splenocyte collection and challenge were performed on Day 39 (25 days post dose 2). Lungs were homogenized for titration of RSV 4 days post challenge.

[0200] Antigen-specific IgG antibody titers were determined on individual serum samples by ELISA. Briefly, 96-well plates were coated with purified inactivated RSV A and incubated overnight at 4°C. Serum samples were serially diluted in blocking buffer starting at 1:200, along with purified mouse IgG (Sigma, ON), at starting concentrations of 200 ng/ml and incubated for 2h at 37°C. Bound antibody was detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, ON). 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, BD Opt EIATM, BD Biosciences, ON) was used as the substrate for HRP. 50 μ l of 1M H₂SO₄ was added to each well to stop the reaction. Absorbance values for each well were detected at 450 nm with a Molecular Devices microplate reader (Molecular Devices, USA). Results are illustrated in FIG. 8. Anti- RSV IgG concentration of approximately 250,000 ng/mL was observed in serum from mice immunised with preF in combination with AS03A, AS03B or AS03C, whereas very little (1828 ng/ml) was observed in serum from mice immunised with preF alone.

[0201] Pooled sera from immunized animals were serially diluted from a starting dilution of 1:8 in RSV medium in 96-well plates (20 μ l/well). Control wells contained RSV medium only or goat anti-RSV antibody at 1:50 (Bioscience international). RSV Long strain was added, the plates were incubated for 20 minutes at 33°C and the mixture was transferred to 96-well flat-bottomed plates previously seeded with 1x10⁵ cells/mL Vero cells. After 5-6 days at the same temperature, supernatants were removed; plates were washed with PBS and adhering cells fixed with 1% paraformaldehyde in PBS for 1 hour, followed by indirect immunofluorescence (IFA). FIG. 9 shows that regardless of the amount of AS03 administered in combination with preF the RSV neutralising antibody titres remained the same (~ 11 log₂), whereas the RSV neutralising antibody titre in the mice immunised without AS03 were significantly lower (~6 log₂).

[0202] Lungs from immunized animals were aseptically removed following euthanasia and washed in RSV medium using 2 volumes of 10 ml / lung in 15 ml tubes. They were then weighed and homogenized individually in RSV medium with an automated Potter homogenizer (Fisher, Nepean ON), and centrifuged at 2655 x g for 2 minutes at 4°C. The virus present in the supernatants was titered. Briefly, lung homogenates were serially diluted in eight replicates starting at a 1:10 on a previously seeded Vero cell (ATCC# CCL-81) monolayer in 96-well plates and incubated for 5-6 days. RSV was detected by indirect IFA. FIG. 10 illustrates results demonstrating that no difference in protection was observed between mice immunised with preF in combination with AS03A, AS03B or AS03C, whereas less protection was observed in mice immunised in absence of AS03.

[0203] These results demonstrate that the PreF antigen can be formulated across a broad range of adjuvant concentrations to produce a composition that elicits an immune response against RSV.

Sequence Listing

SEQ ID NO:1

Nucleotide sequence encoding RSV reference Fusion protein

Strain A2 GenBank Accession No. U50362

atggagttgctaatacctcaaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtcacatttgttttgcttctg
gtcaaaacatcactgaagaattttatcaatcaacatgcagtcagtagcaaaggctatcttagtgctctgag
aactgggttggtataaccagtgttataactatagattaagtaatatcaaggaaaataagtgtaatggaacagat
gctaagggtaaaattgataaacaagaattagataaatataaaaaatgctgtaacagaattgcagttgctcatgc
aaagcaccagcaacaaacaatcgagccagaagagaactaccaagggtttatgaattatacactcaaaatgcc
aaaaaaaccaatgtaacattaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttttggttaggtgttggtatctg
caatcgccagtggtggtgtgtatctaaggctcctgcacctgaagggtgaagtgaaacaagatcaaaagtgtctct
actatccacaaacaaggctgtagtcagttatcaaatggagtttagtgtcttaaccagcaaaagtgttagacctc
aaaaactatatagaaaacaattgttacctattgtgaacaagcaagctgcagcatatcaaatatagcaactg
tatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagattaccaggaatttagtgttaagcaggtgtaact
acacctgtaagcacttacatgttaactaatagtgaattattgtcattatcaatgatatgcctataacaaatg
atcagaaaaagttaatgtccaacaatgttcaaatgttagacagcaaaagttaactctatcatgtccataataaa
agaggaagtcttagcatatgtgtacaattaccactatatgggtgttatagatacacacctgttggaactacac
acatccccctatgtacaaccaacacaaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaactgacagaggtggtta
ctgtgacaatgcaggatcagtatctttcttcccacaagctgaaacatgtaaagtcaaatcaaatcgagtattt
tgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaagttaaactctgcaatgttgacatattcaaccccaaat
atgattgtaaaattatgacttcaaaaacgatgtaagcagctccgttatcacatctctaggagccattgtgtc
atgctatggcaaaaacaatgtacagcatccaataaaaaatcggtgaatcataaagacattttctaacgggtgc
gatatgtatcaataaaaggggtggacactgtgtctgttaggtaacacattatattatgtaaaaagcaagaagg
taaaagtctctatgtaaaaggtgaaccaataataaatttctatgacccttagtattccccctctgatgaattt
gatgcatcaatatctcaagtcaacgagaagattaacagagcctagcattttattcgtaaatccgatgaattat
tacataatgtaaatgctggttaatccaccataaataatcatgataactactataattatagtattatagtaaat
attgttatcttaattgctgttggtgactgctcttataactgtgaaggccagaagcacaccagtcacactaagaaag
atcaactgagtggtataaataatttgcattagtaactaa

SEQ ID NO:2

Amino acid sequence of RSV reference F protein precursor F0

Strain A2 GenBank Accession No. AAB86664

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIITEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGT
DAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLLG
GSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISN
IATVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSI
MSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV
QSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNNKNGRI
KTFSNGCDYVSNGKVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSIYVKGEPIINFYDPIVFPSEFDASISQVNEKINQSLA
FIRKSDLELLHNVNAGKSTINIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDLQSLGINNIAFSN

SEQ ID NO:3

Nucleotide sequence encoding RSV reference G protein

Strain Long

Atgtccaaaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaaagacctgggacactctcaatcatttatta
ttcatatcatcgggcttatataagttaaatcttaaatctatagcacaaatcacattatccattctggcaatg
ataatctcaacttcacttataattacagccatcatattcatagcctcggcaaacacaaagtcacactaaca
actgcaatcatacaagatgcaacaagccagatcaagaacacacaccccaacataacctcactcaggatcctcag
cttggaatcagcttctccaatctgtctgaaattacatcacaaaccaccaccatactagcttcaacaacacca
ggagtcaagtcaaacctgcaacccacacaacagtcaagactaaaaacacacaacaaccccaacacacacccagc
aagcccaactacaaaacaacgcacaaaacacaccccaacacacaccccaataatgattttcacttcgaagtgttt
aactttgtaccctgcagcatatgcagcaacaatccaacctgctgggtatctgcaaaagaataccaaaacaaa
aaaccaggaaagaaaaccaccaccaagcctacaaaaaaacacaccttcaagacacacaaaaagatctcaaa
cctcaaacactaaacaaaaggaagtaccaccaccaagccacagaagagccaaccatcaacaccacacaaa
acaaacatcacactacactgctcacaacaacaccacaggaaatccaaaactcacaagtcaaatggaaacc
ttccactcaacctctcgaaggcaatctaagcccttctcaagtctccacaacatccgagcaccatcacaa
ccctcatctccaccaacacacacacgcagtag

SEQ ID NO:4

Amino acid sequence of RSV reference G protein

MSKNKDQRTAKTLEKTWDTLNHLLFISSGLYKLNLSIAQITLSILAMIISTSLIITAIIFIASANHKVTLT
TAIIQDATSQIKNTTPTYLTQDPQLGISFSNLSEITSQTTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTTQTQPS
KPTTKQRQNKPPNKNDFHFEVFNFPVCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTTKPTKKPTFKTTKKDLK
PQTTKPKVEVPTTKPTEPTINTTKTNITTTLLTNNTTGNPKLTSQMETFHSTSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQ
PSSPNTTRQ

Seq ID NO:5

Nucleotide sequence of PreF analog optimized for CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacgccatcctggccgcgctgaccctg
tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaggagttctaccagtcacactgctccgccgtgtccaagggctac
ctgtccgcctcgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaagaaaaacaag
tgcaacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa
ctccagctgctgatgcagtcacacctgccaccaacaacaagtttctgggcttctgctggcgctgggctcc
gccatcgctcctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcc
ctgctgtccaccaacaagggcgtggtgtccctgtccaacggcgctgtccgtgctgacctccaaggtgctggat
ctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgag
accgtgatcgagttccagcagaagaacaacccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgccggc
gtgaccacccctgtgtccacctacatgctgaaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatc
accaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagc
atcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttctgtg
aagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgctgaccgggaccgac
cggggtggtactgcgacaacgcgggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtc
aacggggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatc
ttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcctg
ggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaacccggggaatcatcaagacc
ttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcggtggacacctgtccgtgggcaacacactgtactac
gtgaataagcaggagggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtg
ttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcac
cggaagtcgcagcagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatc
gagaacgagatcgcccgatcaagaagctgatcggcgaggcctgataatctaga

SEQ ID NO:6

Amino acid sequence of PreF analog

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGT
DAVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLST
NKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQKNNRLLIETREFSVNAGVTTP
VSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT
SPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPK
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKTCTASNKNRGIKTFSGNCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
ARIKKLIGEA

Seq ID NO:7

Nucleotide sequence encoding PreFG_V1 optimized for CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcacgccatcctggccgcgctgaccctg
tgcttcgcctcctcccagaacatcacccaagagttctaccagtcacactgctccgccgtgtccaagggctac
ctgtccgcctcgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaagaaaaacaag
tgcaacggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa
ctccagctgctgatgcagtcacacctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttctgctggcgctgggc
tccgccatcgctcctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagc
gccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgctgtccgtgctgacctccaaggtgctg
gatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatc
gagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgcc
ggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaaaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgcct
atcaccaacgacaaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatg
agcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgctgatcgacaccccttgc
tggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaagggctccaacatctgcctgacccggacc
gaccggggctggtactgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag

tccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgac
atcttcaaccccaagtagactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcc
ctgggcccacatcggtgctcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaag
accttctccaacggctgcgactacgtgtccaataaggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtac
tacgtgaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctg
gtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccagggtcaacgagaagatcaaccagtccttgcccttc
atccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccac
atcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggtggtggcgtctggtggcagcggcggtcc
aagcagcggcagaacaagcctcctaacaagcccaacaacgacttccacttcgaggtgttcaacttcgtgcct
tgctccatctgctccaacaacctacctgctgggccatctgcaagagaatccccaacaagaagcctggcaag
aaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccaca
aagcctaaggaagtgccaccaccaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

Seq ID NO:8

PreFG_V1 peptide for CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKKFLGLLGVSIAISGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLS
TNKAVVSLSNVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT
PVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLH
TSPICTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPIAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNP
KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTCTASNNKRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYVVK
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE
IARIKKLIGEAGSGSGSGSKQRQNKPPNKNDFHEFVFNVPSCSICNNPTCWAICKRI PNKKPGKKTIT
KPTKPTFTKTKDHPQTKPKKEVPTTK

Seq ID NO:9

Nucleotide Sequence encoding PreFG_V2 for CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacggcatcaccgccatcctggccgcgtgaccctg
tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagttctaccagtcacactgctccgcccgtgtccaagggctac
ctgtccgcccctgcggaccggtggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaag
tgcaacggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgcctgaccgaa
ctccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttctgctgggctggggc
tccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggcgaggtgaacaagatcaagagc
gcctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctg
gatctgaagaactacatcgacaagcagctgtgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatc
gagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgcc
ggcgtgaccaaccctgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgcct
atcaccaacgaccaaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatg
agcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttgc
tggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaagagggctccaacatctgctgacccggacc
gaccggggtggtactgcgacaacggcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag
tccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgac
atcttcaaccccaagtagactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcc
ctgggcccacatcggtgctcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaag
accttctccaacggctgcgactacgtgtccaataaggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtac
tacgtgaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctg
gtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccagggtcaacgagaagatcaaccagtccttgcccttc
atccgggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccac
atcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgacggcgaggtggtggcgcaagcagcggcagaacaagcct
cctaacaagcccaacaacgacttccacttcgaggtgttcaacttcgtgccttgctccatctgctccaacaac
cctacctgctgggcatctgcaagagaatccccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcctacc
aagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaaagcctaaggaagtgccaaac
accaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

Seq ID NO:10

PreFG_V2 peptide for CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKKFLGLLGVSIAISGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLS
TNKAVVSLSNVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT
PVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLH
TSPICTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPIAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNP

KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
QEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE
IARIKKLIGEAGGKQRQNKPPNKNDFHFEVFNFPVPCISNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTITKPTKKPT
FKTTKKDHKPQTTKPKEVPTTK

SEQ ID NO:11

Exemplary coiled-coil (isoleucine zipper)
EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

SEQ ID NO:12

PreF antigen polynucleotide CH02

atggagctgcccacatcctgaagaccaacgccatcaccaccatcctcgccgcgctgacctgtgcttcgccagc
agccagaacatcacggaggagtctaccagagcacgtgcagcgccgtgagcaagggctacctgagcgcgctg
cgacgggctggtacacgagcgatcacgatcgagctgagcaacatcaaggagaacaagtgaacggcgacg
gacgcgaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcggtgacggagctgcagctgctg
atgcagagcacgcggcgagcaacaacaagttcctcggttctcctgctggcgctgggcagcgcgatcgcgagc
ggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagtcgcgctgctgagcacg
aacaaggcggtgctgagcctgagcaacggcgctgagcgctgctgacgagcaaggtgctcgacctgaagaactac
atcgacaagcagctgctgcccgatcgtgaadaagcagagctgcagcatcagcaacatcgagaccgtgatcgag
ttccagcagaagaacaaccgcctgctggagatcacgcgggagttctccgtgaacgcaggcgctgacgacgccc
gtgtctacgtacatgctgacgaacagcgagctgctcagcctgatcaacgacatgccgatcacgaacgaccag
aagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtgcgccagcagagctacagcatcatgagcatcatcaaggag
gaggtgctggcatacgtgggtgcagctgcgcgtgtacggcgctcatcgacacgcccctgctggaagctgcacacg
agcccgctgtgcacgaccaacaacgaaggaggcgcaacatctgcctgacgggacggaccggggctggtac
tgcgacaacgcgggcagcgctgagcttcttcccgctcgccggagacgtgcaaggtgcagagcaaccgcgtcttc
tgcgacacgatgaacagcctgacgtgcccagcgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccgaag
tacgactgcaagatcatgacgagcaagaccgatgtcagcagcagcgctgatcacgagcctcggcgcgatcgtg
agctgctacggcaagacgaagtgacggcgagcaacaagaaccgcggcatcatcaagacgttcagcaacggc
tgcgactatgtgagcaacaagggcggtggacactgtgagcgctcggaacacgctgtactacgtgaacaagcag
gagggaagagcctgtacgtgaagggcgagccgatcatcaacttctacgaccgcctcgtgttcccgagcgac
gagttcgacgcgagcatcagccaagtgaacgagaagatcaaccagagcctggcgcttcacccgaagagcgac
gagaagctgcacaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatc
gcgcgatcaagaagctgatcggcgaggcgcatcatcaccatcaccattga

SEQ ID NO:13

PreF antigen polynucleotide with intron

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgccatcctggccgcgctgacctgtgcttcgcctcc
tccagaacatcaccgaggagtcttaccagtccacctgctccgcgctgtccaagggctacctgtccgcctg
cggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacc
gacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaacctccagctgctg
atgcagtcacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttccctgctggcgctgggctccgcctcgcctcc
ggcatcgccgtgagcaaggtacgtgtcgggactgtgttcccttttttaataaaaagttatatctttaat
ggtatatacatatgttctgtatgtgatccatgtgttatgactttgtttatcatgtgttttaggtgctgcacc
tggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacg
gcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtga
acaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctgg
agatcaccgcgagttctccgtgaacgcggcgctgaccacctgtgtccacctacatgctgaccaactccg
agctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcaga
tcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaagggaagaggtgctggcctacgtgggtgcagctgc
ctctgtaaggcgctgatcgacaccttctggtgaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaagg
agggtcccaacatctgcctgacctggaccgacggggctggtactgcgacaacgcgggctccgtgtccttct
tccctctggcgagacctgcaaggtgcagtcacaacgggtgttctgcgacacatgaactccctgacctgc
cttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaaga
ccgacgtgtcctccagcgatcacctccctgggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccg
cctccaacaagaaccgggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataaggggcggtg
acaccgtgtccgtggggaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaagagcctgtacgtgaaggcg
agcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtga
acgagaagatcaaccagtccttggccttcatccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaaga
tcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccgatcaagaagctgatcggcgagg
ccgaggtcaccaccaccatcaccactga

SEQ ID NO:14
Synthetic linker sequence
GSGSGSGS

SEQ ID NO:15
Furin cleavage site
RARR

SEQ ID NO:16
Furin cleavage site
RKRR

SEQ ID NO:17
Nucleotide Sequence encoding PreF_NGTL
atggagctgctgatacctgaaaaccaacgccatcacgcacatcctggccgcgctgaccctgtgcttcgcctcc
tcccagaacatcacccgaggagttctaccagtcacacctgctccgcgctgtccaagggctacctgtccgcctg
cggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacc
gacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctg
atgcagtcacacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttccctgctgggctgggctccgccatcgccctcc
ggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccacc
aacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgctgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactac
atcgacaagcagctgctgcctatcgatgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgag
ttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgcggcgctgaccacccct
gtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccag
aaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgctgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaa
gaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgctgatcgacaccccttgcctgggaagctgcacacc
tccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgacccggaccgaccggggctggtac
tgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggcggagacctgcaaggtgcagtcacaacgggtgttc
tgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaag
tacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgaagctgtccctccagcgtgatcacctccctggcgccatcgctg
tccgtctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccgggaatcatcaagaccttctccaacggc
tgcgactacgtgtccaataaggcgctggacacogtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcag
gagggcaagagcctgtacgtgaaggggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgac
gagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggacctggccttccatccggaagtccgac
gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatc
gcccggtcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO:18
Amino Acid Sequence of PreF_NGTL
MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGT
DAKVLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLGVSALIASGIAVSKVLHLEGEVKNIKSALLST
NKAVVSLSNGVSVLTskvldlknyidkqllpivnkqscsisniETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTP
VSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT
SPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPK
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKTKCTASKNRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINGTILAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
ARIKKLIGEA

SEQ ID NO:19
Nucleotide Sequence encoding PreF_L112Q
atggagctgctgatacctgaaaaccaacgccatcacgcacatcctggccgcgctgaccctgtgcttcgcctcc
tcccagaacatcacccgaggagttctaccagtcacacctgctccgcgctgtccaagggctacctgtccgcctg
cggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacc
gacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctg
atgcagtcacacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttccctgctgggctgggctccgccatcgccctcc
ggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccacc
aacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgctgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactac
atcgacaagcagctgctgcctatcgatgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgag
ttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgcggcgctgaccacccct
gtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccag
aaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgctgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaa

gaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacc
 tccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgacccggaccgacccggggtggtac
 tgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtgcaacccgggtgttc
 tgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacccaag
 tacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgccatcgtg
 tccgtctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggc
 tgcgactacgtgtccaataaggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcag
 gagggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgac
 gagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtccttggccttcatccggaagtccgac
 gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatc
 gcccgatcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO:20

Amino Acid Sequence of PreF_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
 DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLST
 NKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTP
 VSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT
 SPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPK
 YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVKNQ
 EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
 ARIKKLIGEA

SEQ ID NO:21

Nucleotide Sequence encoding PreF_NGTL_L112Q

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccccatcctggcgcgtgacctgtgcttcgcctcc
 tccagacatcacccgaggagttctaccagtccacctgtccgcgtgtccaagggtacctgtccgcctg
 cggaccggtggttacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacc
 gacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctg
 atgcagtcacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttccgtgcaggcggtgggtccgcctatgcctcc
 ggcctgcgcgtgagcaaggtgctgcacctggaggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccacc
 aacaaggcgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactac
 atcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgag
 ttccagcagaagaacaaccggtgctggagatcaccccgaggttctccgtgaacgcggcggtgaccacctct
 gtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccag
 aaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaa
 gaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacc
 tccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgacccggaccgacccggggtggtac
 tgcgacaacgcgggtccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtgcaacccgggtgttc
 tgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacccaag
 tacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgccatcgtg
 tccgtctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggc
 tgcgactacgtgtccaataaggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcag
 gagggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgac
 gagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggacctggccttcatccggaagtccgac
 gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatc
 gcccgatcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO:22

Amino Acid Sequence of PreF_NGTL_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
 DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLST
 NKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTP
 VSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT
 SPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPK
 YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVKNQ
 EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI
 ARIKKLIGEA

We claim:

1. A recombinant respiratory syncytial virus (RSV) antigen comprising a soluble F protein polypeptide comprising an F₂ domain and an F₁ domain of an RSV F protein polypeptide, wherein the F protein polypeptide comprises at least one modification that alters glycosylation.
2. The recombinant RSV antigen of claim 1, wherein the F protein polypeptide comprises at least one modification selected from:
 - (i) an addition of an amino acid sequence comprising a heterologous trimerization domain;
 - (ii) a deletion of at least one furin cleavage site;
 - (iii) a deletion of at least one non-furin cleavage site;
 - (iv) a deletion of one or more amino acids of the pep27 domain; and
 - (v) at least one substitution or addition of a hydrophilic amino acid in a hydrophobic domain of the F protein extracellular domain.
3. The recombinant RSV antigen of claim 1, wherein the modification that alters glycosylation comprises a substitution of one or amino acids comprising and/or adjacent to the amino acid corresponding position 500 of SEQ ID NO:2.
4. The recombinant RSV antigen of claim 1 or 3, wherein amino acids corresponding to positions 500-502 of SEQ ID NO:2 are selected from: NGS; NKS; NGT; NKT.
5. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-4, wherein the modification that alters glycosylation comprises a substitution of glutamine at the amino acid corresponding to position 500 of SEQ ID NO:2.
6. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-5, wherein the soluble F protein polypeptide comprises an intact fusion peptide between the F₂ domain and the F₁ domain.
7. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-6, wherein the at least one modification comprises the addition of an amino acid sequence comprising a heterologous trimerization domain.

8. The recombinant RSV antigen of claim 7, wherein the heterologous trimerization domain is positioned C-terminal to the F₁ domain.
9. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-8, comprising an F₂ domain and an F₁ domain with no intervening furin cleavage site.
10. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-9, wherein the RSV antigen assembles into a multimer
11. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-10, wherein the RSV antigen assembles into a trimer.
12. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-11, wherein the F₂ domain comprises at least a portion of an RSV F protein polypeptide corresponding to amino acids 26-105 of the reference F protein precursor polypeptide (F₀) of SEQ ID NO:2.
13. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-12 and wherein the F₁ domain comprises at least a portion of an RSV F protein polypeptide corresponding to amino acids 137-516 of the reference F protein precursor polypeptide (F₀) of SEQ ID NO:2.
14. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-13, wherein the F₂ domain comprises an RSV F protein polypeptide corresponding to amino acids 26-105 and/or wherein the F₁ domain comprises an RSV F protein polypeptide corresponding to amino acids 137-516 of the reference F protein precursor polypeptide (F₀) of SEQ ID NO:2.
15. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-14, wherein the RSV antigen is selected from the group of:
 - a) a polypeptide comprising SEQ ID NO:22;
 - b) a polypeptide encoded by SEQ ID NO:21 or by a polynucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions over substantially its entire length to SEQ ID NO:21;
 - c) a polypeptide with at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:22.
16. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-15, wherein the F₂ domain comprises amino acids 1-105 of the RSV F protein polypeptide.

17. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-16, wherein the F₂ domain and the F₁ domain are positioned with an intact fusion peptide and without an intervening pep27 domain.

18. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-17, wherein the heterologous trimerization domain comprises a coiled-coil domain.

19. The recombinant RSV antigen of claim 18, wherein the multimerization domain comprises an isoleucine zipper.

20. The recombinant RSV antigen of claim 19, wherein the isoleucine zipper domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:11.

21. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-20, wherein the RSV antigen comprises at least one substitution or addition of a hydrophilic amino acid in a hydrophobic domain of the F protein extracellular domain.

22. The recombinant RSV antigen of claim 21, wherein the hydrophobic domain is the HRB coiled-coil domain of the F protein extracellular domain.

23. The recombinant RSV antigen of claim 22, wherein the HRB coiled-coil domain comprises the substitution of a charged residue in place of a neutral residue at the position corresponding to amino acid 512 of the reference F protein precursor (F₀) of SEQ ID NO:2.

24. The RSV antigen of claim 23, wherein the HRB coiled-coil domain comprises a substitution of lysine or glutamine for leucine at the position corresponding to amino acid 512 of the reference F protein precursor (F₀) of SEQ ID NO:2.

25. The recombinant RSV antigen of claim 21, wherein the hydrophobic domain is the HRA domain of the F protein extracellular domain.

26. The recombinant RSV antigen of claim 25, wherein the HRA domain comprises the addition of a charged residue following the position corresponding to amino acid 105 of the reference F protein precursor (F₀) of SEQ ID NO:2.

27. The recombinant RSV antigen of claim 26, wherein the HRA domain comprises the addition of a lysine following the position corresponding to amino acid 105 of the reference F protein precursor (F₀) of SEQ ID NO:2.

28. The recombinant RSV antigen of any one of claims 21-27, wherein the RSV antigen comprises at least a first substitution or addition of a hydrophilic amino acid in the HRA domain and at least a second substitution or addition of a hydrophilic amino acid in the HRB domain of the F protein extracellular domain.

29. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-28, wherein the RSV antigen comprises at least one amino acid addition, deletion or substitution that eliminates a furin cleavage site present in a naturally occurring F protein precursor (F₀).

30. The recombinant RSV antigen of 29, wherein the RSV antigen comprises an amino acid addition, deletion or substitution that eliminates a furin cleavage site at a position corresponding to amino acids 105-109, a position corresponding to amino acids 133-136, or at both positions corresponding to amino acids 105-109 and 133-136 of the reference F protein precursor (F₀) of SEQ ID NO:2.

31. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-30, wherein the F₁ and F₂ polypeptide domains correspond in sequence to the RSV A Long strain.

32. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-31, wherein the RSV antigen comprises a multimer of polypeptides.

33. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-31, wherein the RSV antigen comprises a trimer of polypeptides.

34. An immunogenic composition comprising the recombinant RSV antigen of any one of claims 1-33, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

35. The immunogenic composition of claim 34, further comprising an adjuvant.

36. The immunogenic composition of claim 35, wherein the adjuvant comprises at least one of: 3D-MPL, QS21, an oil-in-water emulsion, and Alum.

37. The immunogenic composition of claim 36, wherein the adjuvant comprises an oil-in-water emulsion.

38. The immunogenic composition of claim 36 or 37, wherein the oil-in-water emulsion comprises a tocol.

39. The immunogenic composition of any one of claims 36-38, wherein the oil-in-water emulsion comprises less than 5 mg squalene per human dose.

40. The immunogenic composition of any one of claims 35-39, wherein the adjuvant is suitable for administration to a neonate.

41. The immunogenic composition of any one of claims 34-40, wherein when the immunogenic composition comprises the recombinant RSV antigen of any one of claims 1-33 the immunogenic composition further comprises a G protein polypeptide comprising an amino acid sequence corresponding to amino acid positions 149 to 229 of an RSV G protein polypeptide.

42. The immunogenic composition of any one of claims 34-41, further comprising at least one additional antigen of a pathogenic organism other than RSV.

43. A recombinant nucleic acid comprising a polynucleotide sequence that encodes the recombinant RSV antigen of any one of claims 1-33.

44. The recombinant nucleic acid of claim 43, wherein the polynucleotide sequence that encodes the RSV antigen is codon optimized for expression in a selected host cell.

45. The recombinant nucleic acid of claim 43 or 44, wherein the nucleic acid comprises a polynucleotide sequence selected from:

- a) a polynucleotide sequence comprising SEQ ID NO:21;
- b) a polynucleotide sequence that encodes SEQ ID NO:22;
- c) a polynucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions over substantially its entire length to SEQ ID NO:21;
- d) a polynucleotide sequence with at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:21, which polynucleotide sequence does not correspond to a naturally occurring RSV strain.

46. A vector comprising the recombinant nucleic acid of any one of claims 43-45.

47. A host cell comprising the nucleic acid of claim 43 or 44 or the vector of claim 46.

48. The use of the RSV antigen of any one of claims 1-33 in the preparation of a medicament for treating an RSV infection.

49. The use of the RSV antigen or nucleic acid of claim 48, wherein the medicament is administered for the purpose of prophylactically treating an RSV infection.

50. A method for eliciting an immune response against Respiratory Syncytial Virus (RSV), the method comprising:

administering to a subject a composition comprising the recombinant RSV antigen of any one of claims 1-33 or the immunogenic composition of any one of claims 34-42.

51. The method of claim 50, wherein administering the composition comprising the RSV antigen elicits an immune response specific for RSV without enhancing viral disease following contact with RSV.

52. The method of claims 50 or 51, wherein the immune response comprises a protective immune response that reduces or prevents infection with a RSV and/or reduces or prevents a pathological response following infection with a RSV.

53. The method of any one of claims 50-52, wherein the subject is a human subject.

54. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-33 or the immunogenic composition of any one of claims 34-42 for use in medicine.

55. The recombinant RSV antigen of any one of claims 1-33 or the immunogenic composition of any one of claims 34-42 for the prevention or treatment of RSV-associated diseases.

56. A method for producing a recombinant RSV antigen with an altered glycosylation pattern, the method comprising:

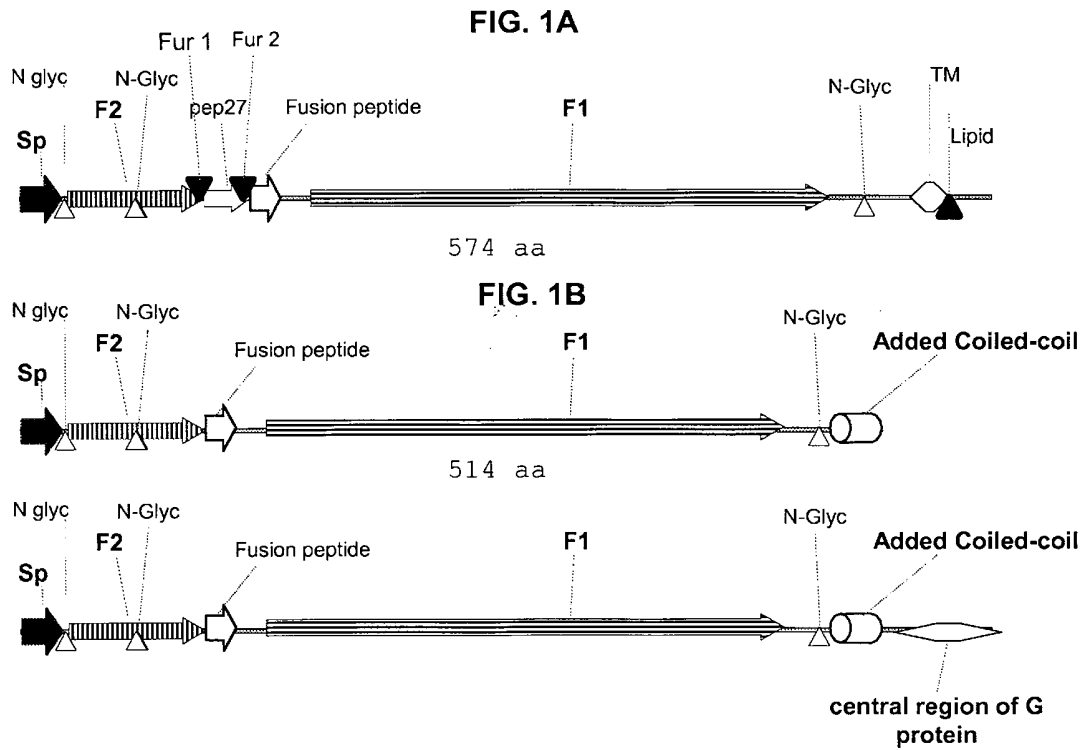
- (i) expressing a nucleic acid of any one of claims 43-45 in a host cell; and
- (ii) isolating the recombinant RSV antigen expressed thereby.

57. A method for increasing expression of an RSV fusion protein polypeptide, the method comprising:

expressing in a host cell an a nucleic acid encoding an RSV fusion protein polypeptide comprising at least one mutation that produces an amino acid addition, deletion or substitution, which amino acid addition, deletion or substitution alters a glycosylation site of the encoded RSV fusion protein polypeptide as compared to a naturally occurring RSV fusion protein, whereby altering the glycosylation site increases expression of the RSV fusion protein polypeptide as compared to an RSV fusion protein without the amino acid addition, deletion or substitution.

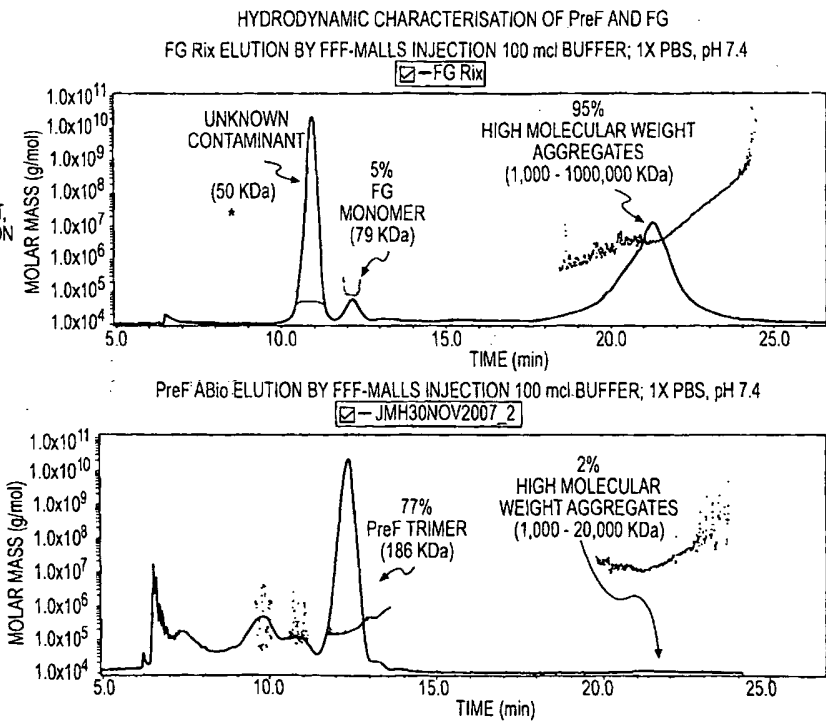
58. The method of claim 57, wherein the nucleic acid encoding the RSV fusion protein polypeptide further comprises an additional mutation that produces an amino acid addition, deletion or substitution that eliminates a peptidase cleavage site within the encoded RSV fusion protein polypeptide.

59. The method of claim 57 or 58, wherein the RSV fusion protein polypeptide is a recombinant fusion protein polypeptide stabilized in the prefusion conformation.



FG
*UNKNOWN MOLAR
EXTINCTION COEFFICIENT,
SO UNKNOWN PROPORTION

FIG. 2



47

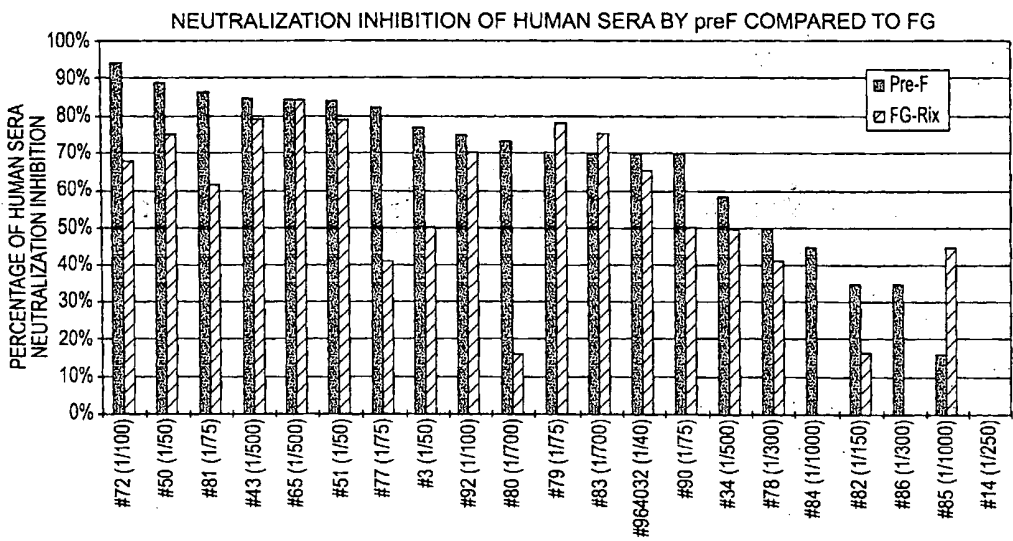


FIG. 3

FIG. 4A
Serology in immunized mice, CHO-preF

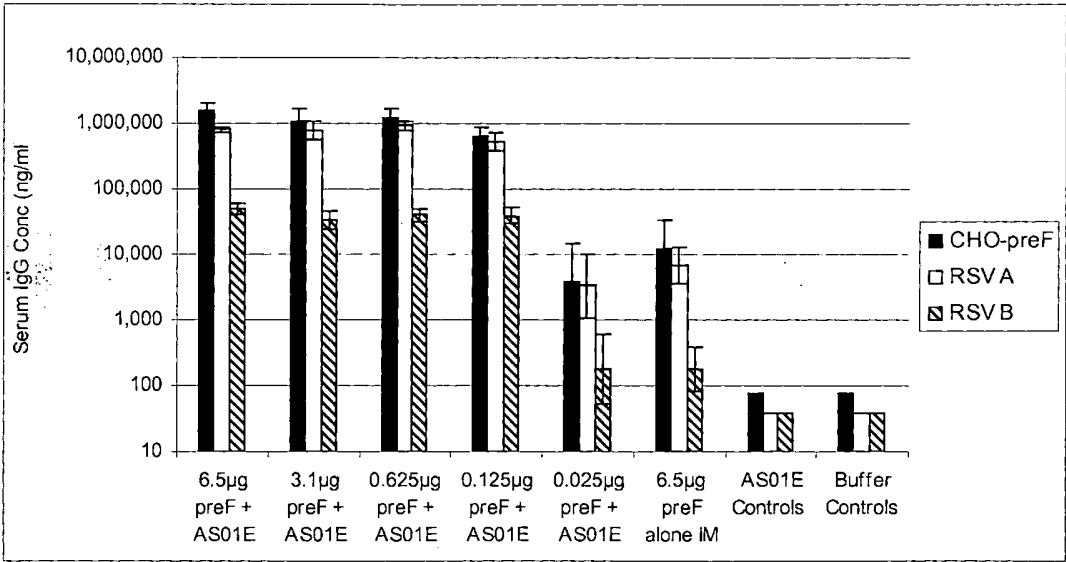


FIG. 4B
Serology in immunized mice, CHO-preF

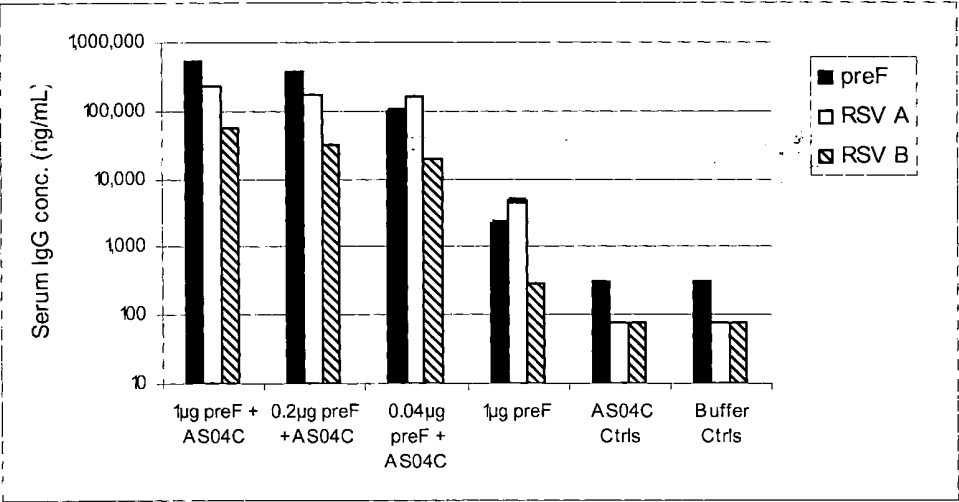
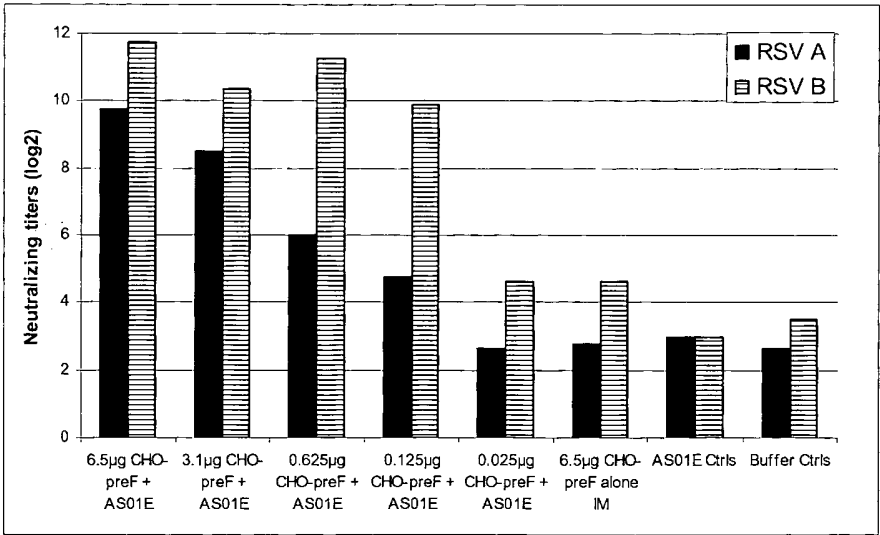


FIG. 5A
Evaluation of CHO-preF in vivo
Neutralization titers



* Same assay, sera taken from different animal study

50

FIG. 5B
Evaluation of CHO-preF in vivo
Neutralization titers

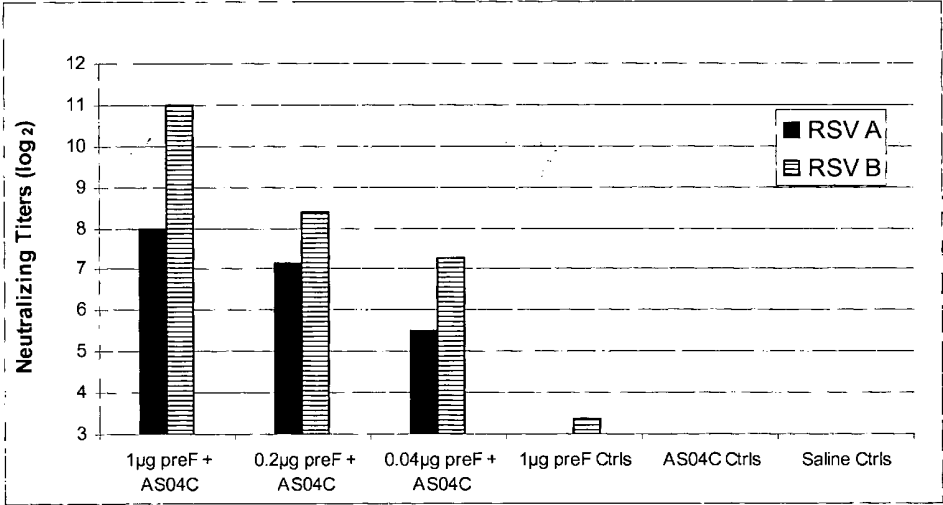


FIG. 6A
CHO-preF protection against challenge

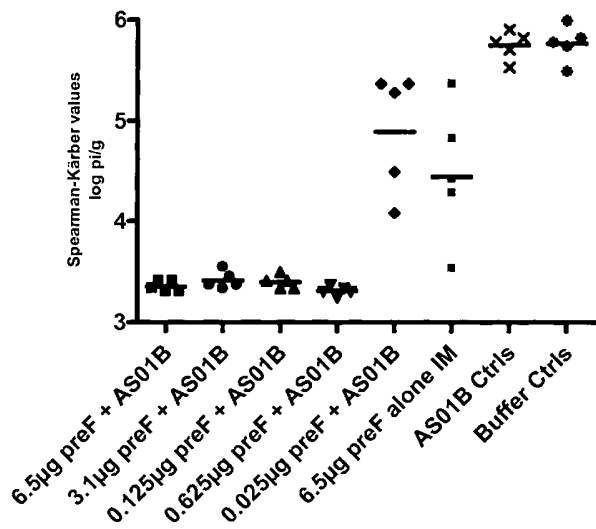


FIG. 6B
CHO-preF protection against challenge

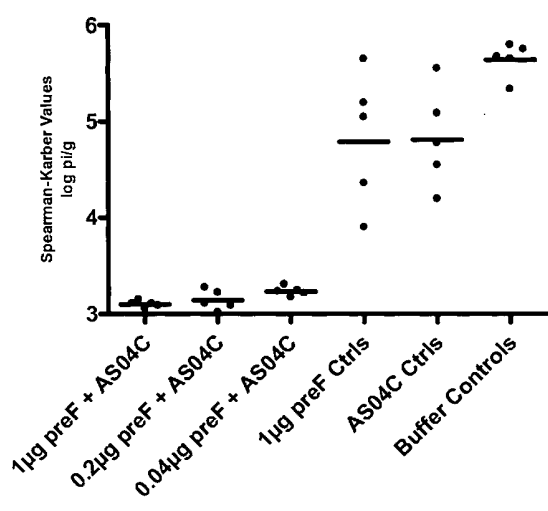


FIG. 7
Pulmonary eosinophil recruitment following challenge in mice

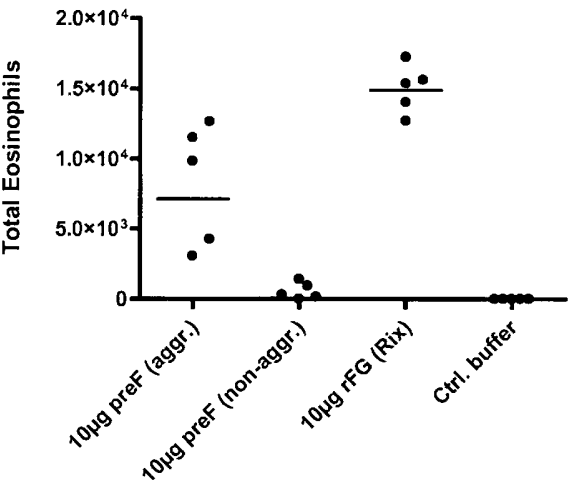


FIG. 8
Serum IgG levels in mice immunized with PreF formulated with
an oil-in-water emulsion adjuvant

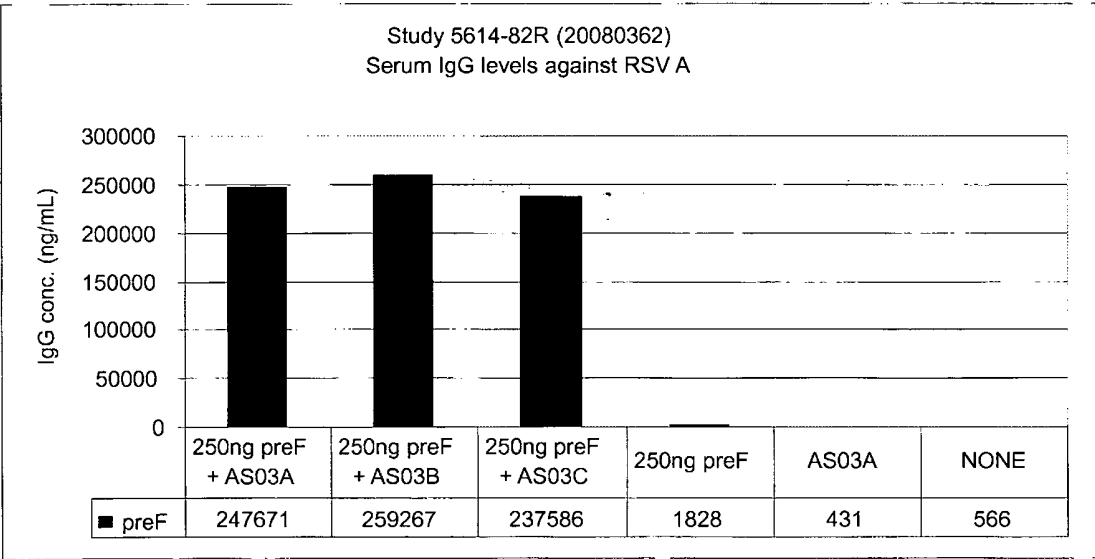
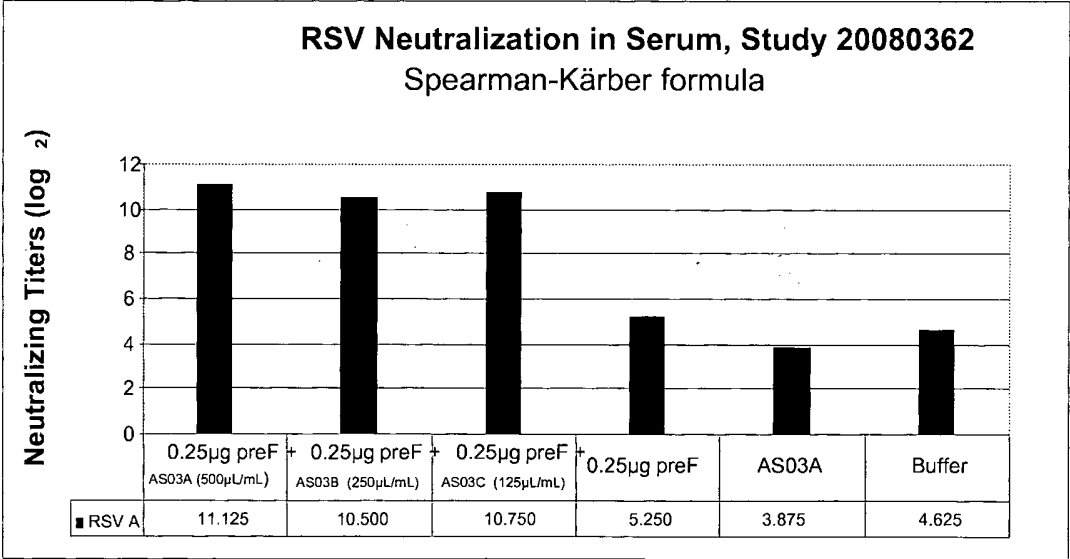


FIG. 9
Neutralizing Antibody Titers in Mice immunized with PreF
formulated with an oil-in-water emulsion adjuvant



53

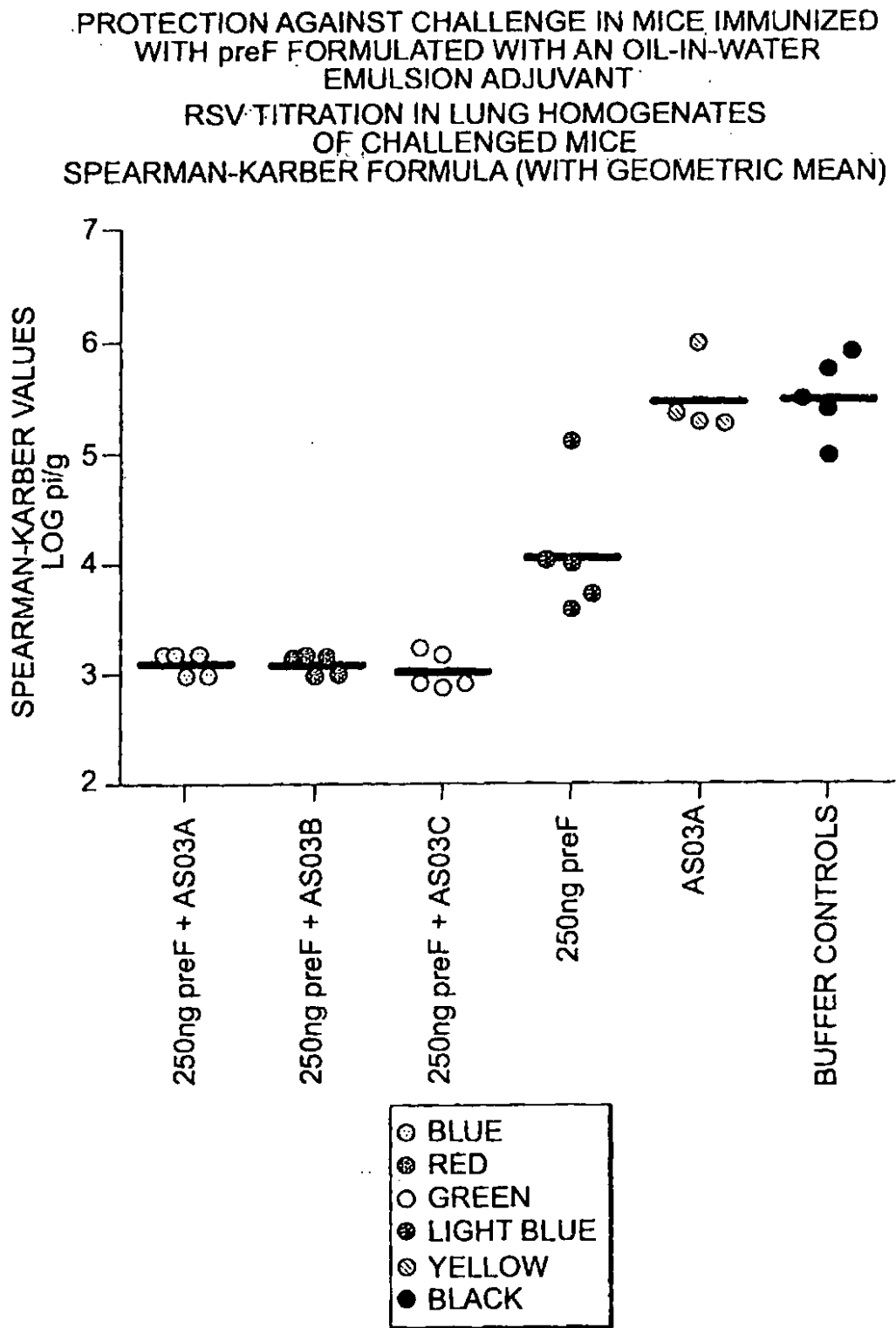


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/155 C07K14/135
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTÍN DIANA ET AL: "Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity." June 2006 (2006-06), THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY JUN 2006 LNKD- PUBMED:16690930, VOL. 87, NR. PT 6, PAGE(S) 1649 - 1658 , XP002600413 ISSN: 0022-1317 abstract; introduction;; page 87; figure 1	1-59

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2010

Date of mailing of the international search report

22/10/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059008

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONZÁLEZ-REYES L ET AL: "Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion." 14 August 2001 (2001-08-14), PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 14 AUG 2001 LNKD-PUBMED:11493675, VOL. 98, NR. 17, PAGE(S) 9859 - 9864 , XP002600414 ISSN: 0027-8424 abstract;; page 9862	1-59
Y	YIN HSIEN-SHENG ET AL: "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation." 5 January 2006 (2006-01-05), NATURE 5 JAN 2006 LNKD- PUBMED:16397490, VOL. 439, NR. 7072, PAGE(S) 38 - 44 , XP002600415 ISSN: 1476-4687 abstract, introduction; page 38; figure 1	1-59
Y	SCHMIDT A C ET AL: "Mucosal immunization of Rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD- DOI:10.1128/JVI.76.23.12355-12359.2002, vol. 76, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 1089-1099, XP002978183 ISSN: 0022-538X the whole document	1-59
A	HUANG YAN ET AL: "Modulation of protective immunity, eosinophilia, and cytokine responses by selective mutagenesis of a recombinant G protein vaccine against respiratory syncytial virus." April 2005 (2005-04), JOURNAL OF VIROLOGY APR 2005 LNKD- PUBMED:15767454, VOL. 79, NR. 7, PAGE(S) 4527 - 4532 , XP002600416 ISSN: 0022-538X the whole document -/--	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANG RODERICK S ET AL: "Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys." October 2004 (2004-10), JOURNAL OF VIROLOGY OCT 2004 LNKD- PUBMED:15452239, VOL. 78, NR. 20, PAGE(S) 11198 - 11207 , XP002600417 ISSN: 0022-538X the whole document	1-59
Y	VALARCHER J-F ET AL: "Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves." June 2006 (2006-06), THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY JUN 2006 LNKD- PUBMED:16690931, VOL. 87, NR. PT 6, PAGE(S) 1659 - 1667 , XP002600418 ISSN: 0022-1317 abstract;figure 1	1-59
A,P	WO 2009/079796 A1 (ID BIOMEDICAL CORP OF QUEBEC [CA]; GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BAU) 2 July 2009 (2009-07-02); the whole document	1-59
Y	WO 02/42326 A1 (BIOTA SCIENT MANAGEMENT [AU]; MASON ANTHONY JOHN [AU]; TUCKER SIMON PE) 30 May 2002 (2002-05-30) claims 40,44, 59-62	1-59
A	VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S ET AL: "Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication" REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY, CHICHESTER, GB LNKD- DOI:10.1002/RMV.518, vol. 17, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 5-34, XP002510797 ISSN: 1052-9276 [retrieved on 2006-09-27] the whole document -/-	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLSON MATTHEW R ET AL: "Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 7, no. 8, 1 October 2008 (2008-10-01) , pages 1239-1255, XP009138398 ISSN: 1476-0584 the whole document	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/059008

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2009079796	A1	02-07-2009	AU	2008340949 A1		02-07-2009
			CA	2710600 A1		02-07-2009
			EP	2222710 A1		01-09-2010
WO 0242326	A1	30-05-2002	AU	2327502 A		03-06-2002
			US	2004161846 A1		19-08-2004

ANTÍGENOS DE VIRUS DE SINCICIO RESPIRATORIO RECOMBINANTES**REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS**

5 Esta solicitud reclama el beneficio de las fechas de presentación anteriores de las solicitudes provisionales de los Estados Unidos 61/334,568, presentada el 13 de mayo de 2010 y 61/219,964, presentada el 24 de junio de 2009, las descripciones de las cuales son incorporadas aquí por referencia.

10 **NOTIFICACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DE CONFORMIDAD CON 37**

C.F.R. § 1.71(E)

 Una porción de la descripción de este documento de patente contiene material que está sujeto a protección de derechos de autor. El
15 propietario de derechos de autor no tiene objeción a la reproducción de facsímil por cualquiera de los documentos de patente de la presente descripción, como aparece en el archivo o registros de patente de la Oficina de Patentes y Marcas, pero de otra manera reserva todos los derechos cualesquiera que éstos sean.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 Esta descripción se refiere al campo de inmunología. Muy

57

particularmente, esta descripción se refiere a composiciones y métodos para provocar una respuesta inmunológica específica para virus de sincicio respiratorio (RSV).

El virus de sincicio respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés) humano es la causa más común a nivel mundial de infecciones del tracto respiratorio inferior (LRI, por sus siglas en inglés) en niños menores de 6 meses de edad y bebés prematuros de menos de o igual a 35 semanas de gestación. El espectro de enfermedad de RSV incluye una amplia disposición de síntomas respiratorios, desde rinitis y otitis hasta neumonía y bronqueolitis, las últimas dos enfermedades estando asociadas con morbilidad y mortalidad considerables. Los humanos son el único reservorio conocido para RSV. La diseminación del virus de secreciones nasales contaminadas ocurre por gotas respiratorias grandes, por lo que el contacto cercano con un individuo infectado o superficie contaminada es requerido para la transmisión. RSV puede perdurar durante varias horas en juguetes u otros objetos, lo que explica la alta tasa de infecciones de RSV nosocomiales, particularmente en ambientes pediátricos.

Las cifras de infección y mortalidad anuales globales para RSV se estima que son de 64 millones y 160,000 respectivamente. Sólo en los Estados Unidos, se estima que el RSV es responsable de 18,000 a 75,000 hospitalizaciones y de 90 a 1900 muertes al año. En climas templados, el RSV está bien documentado como una causa de epidemia de invierno anual de LRI agudo, incluyendo bronqueolitis y neumonía. En los Estados Unidos, casi

todos los niños ya han sido infectados con RSV a los dos años de edad. La tasa de incidencia de LRI asociado con RSV en niños de otra manera sanos se calcula como 37 por 1000 niños-año en los primeros dos años de vida (45 por 1000 niños-año en niños menores de 6 meses de edad) y el riesgo de hospitalización como 6 por 1000 niños-año (por 1000 niños-año en los primeros seis meses de vida). La incidencia es más alta en niños con enfermedad cardiopulmonar y en aquellos niños nacidos prematuramente, quienes constituyen casi la mitad de las admisiones a hospitales relacionadas con RSV en los Estados Unidos. Los niños que experimentan un LRI más severo por RSV más tarde tienen una incidencia incrementada de asma infantil. Estos estudios demuestran una amplia necesidad de vacunas contra RSV, así como el uso de las mismas, en países industrializados, en donde los costos de cuidado para pacientes con LRI severa y sus secuelas son sustanciales. El RSV también es cada vez más reconocido como una causa importante de morbilidad de enfermedad similar a la influenza en personas de edad avanzada.

Se han intentado varios enfoques en esfuerzos para producir una vacuna contra RSV segura y efectiva que produzca respuestas inmunológicas durables y protectoras en salud y en poblaciones sanas y en riesgo. Sin embargo, ninguno de los candidatos evaluados hasta la fecha ha probado ser seguro y efectivo como vacunas para el propósito de prevenir infección por RSV y/o reducir o prevenir enfermedad de RSV, incluyendo infecciones respiratorias inferiores (LRIs).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta descripción se refiere a antígenos de virus de sincicio respiratorio (RSV) recombinante. De manera más específica, esta descripción
5 se refiere a antígenos que incluyen una proteína F recombinante que ha sido modificada para estabilizar la conformación de prefusión trimérica. Los antígenos recombinantes descritos presentan inmunogenicidad superior, y en particular son utilizados favorablemente como componentes de composiciones inmunogénicas (v.gr., vacunas) para protección contra infección y/o
10 enfermedad de RSV. También se describen ácidos nucleicos que codifican los antígenos recombinantes, composiciones inmunogénicas que contienen los antígenos y métodos para producir y usar los antígenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15

La figura 1A es una ilustración esquemática que resalta características estructurales de la proteína F de RSV. La figura 1B es una ilustración esquemática de antígenos de prefusión F de RSV (PreF) ilustrativos.

20

La figura 2 es una gráfica de líneas que ilustra resultados de análisis de fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AFF-MALS) de PreF.

La figura 3 es una gráfica de barras que muestra inhibición de

neutralización de suero humano por antígeno PreF.

Las figuras 4A y B son gráficas de barra que muestran títulos de IgG en el suero producidos en ratones en respuesta a antígeno PreF.

Las figuras 5A y B son gráficas de barras que ilustran títulos de anticuerpos neutralizantes específicos para RSV producidos por antígeno PreF.

Las figuras 6A y B son gráficas que indican protección contra desafío provisto por el antígeno PreF de RSV en ratones.

La figura 7 es una gráfica que evalúa leucocitos BAL después de inmunización y desafío.

La figura 8 es una gráfica de barras que ilustra IgG en el suero producida después de inmunización con PreF formulada con diluciones de una emulsión de aceite en agua (AS03).

La figura 9 es una gráfica de barras que ilustra es una gráfica de barras que ilustra después de inmunización con PreF formulada con diluciones de una emulsión de aceite en agua (AS03).

La figura 10 es una gráfica que ilustra protección contra desafío después de inmunización con PreF formulada con diluciones de una emulsión de aceite en agua (AS03).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Introducción

El desarrollo de vacunas para prevenir infección por RSV ha sido complicado por el hecho de que las respuestas inmunológicas del hospedero parecen jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad. Estudios tempranos en la década de 1960 mostraron que los niños vacunados con una vacuna contra RSV inactivado con formalina sufrieron de enfermedad más severa a la exposición subsiguiente al virus, en comparación con los sujetos de control no vacunados. Estos ensayos tempranos dieron como resultado la hospitalización de 80% de vacunados y dos muertes. La severidad incrementada de la enfermedad ha sido reproducida en modelos animales y se piensa que resulta de niveles inadecuados de anticuerpos neutralizantes de suero, falta de inmunidad local e inducción excesiva de una respuesta inmunológica similar a células T auxiliares de tipo 2 (Th2) con eosinofilia pulmonar y producción incrementada de citocinas IL-4 y IL-5. Por el contrario, una vacuna exitosa que protege contra infección por RSV induce una respuesta inmunológica derivada por Th1, caracterizada por la producción de IL-2 y γ -interferón (IFN).

La presente descripción se refiere a antígenos de virus de sincicio respiratorio (RSV) recombinantes que resuelven problemas encontrados con antígenos de RSV anteriormente usados en vacunas, y mejoran las propiedades inmunológicas así como de fabricación del antígeno.

Los antígenos de RSV recombinantes descritos aquí implican un análogo de proteína de fusión (F) que incluye un polipéptido de proteína F soluble, que ha sido modificado para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F, es decir, la conformación de la proteína F ensamblada madura antes de fusión con la membrana celular del hospedero. Estos análogos de proteína F se designan "PreF" o "antígenos PreF", para propósitos de claridad y simplicidad. Los antígenos PreF descritos aquí se fundamentan en el descubrimiento imprevisto de que análogos de proteína F solubles que han sido modificados 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*.

Los detalles de la estructura de la proteína F de RSV se proveen aquí con referencia a terminología y designaciones ampliamente aceptadas en la técnica, y se ilustran esquemáticamente en la figura 1A. Una ilustración esquemática de antígenos PreF ilustrativos se provee en la figura 1B. Los expertos en la técnica entenderán que cualquier proteína F de RSV puede ser modificada para estabilizar la conformación de prefusión de conformidad con las enseñanzas provistas aquí. Por lo tanto, para facilitar el entendimiento de los principios que guían la producción de antígenos PreF, componentes estructurales individuales se indicarán con referencia a una proteína F ilustrativa, la secuencia de polinucleótidos y aminoácidos de los cuales se proveen en SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente. De manera similar, en donde es aplicable, los antígenos de proteína G se describen con referencia a

una proteína G ilustrativa, cuyas secuencias de polinucleótido y aminoácidos se proveen en SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente.

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

El término F0 se refiere a un precursor de proteína F traducido de longitud completa. El polipéptido F0 puede ser subdividido en un dominio F2 y un dominio F1 separados por un péptido intermedio, designado pep27. Durante la maduración, el polipéptido F0 sufre digestión proteolítica en dos sitios de furina situados entre F2 y F1 y que flanquean a pep27. Para el propósito de asegurar la discusión, un dominio de F2 incluye por lo menos una porción de, y cuando mucho todos, los aminoácidos 1-109, y una porción soluble de un dominio F1 incluye por lo menos una porción de y hasta todos, los aminoácidos 137-526 de la proteína F. Como se indicó anteriormente, estas posiciones de aminoácidos (y todas las posiciones de aminoácidos subsiguientes designadas aquí) se dan en referencia al polipéptido precursor de proteína F ilustrativo (F0) de SEQ ID NO:2.

El antígeno PreFusión F (o "PreF") es un análogo de proteína F soluble (es decir, no unido a membrana) que incluye por lo menos una modificación que estabiliza la conformación de prefusión de la proteína F, de tal manera que el antígeno RSV retiene por lo menos un epítipo inmunodominante de la conformación de prefusión de la proteína F. El polipéptido de proteína F soluble incluye un dominio F2 y un dominio F1 de la

proteína F de RSV (pero no incluye un dominio de transmembrana de proteína F de RSV). En modalidades ilustrativas, el dominio F2 incluye los aminoácidos 26-105 y el dominio F1 incluye los aminoácidos 137-516 de una proteína F. Sin embargo, también se pueden usar porciones más pequeñas, siempre que se mantenga la conformación tridimensional del antígeno PreF estabilizado. De manera similar, también se pueden usar polipéptidos que incluyen componentes estructurales adicionales (v.gr., polipéptidos de fusión) en lugar de los dominios F2 y F1 ilustrativos, siempre que los componentes adicionales no alteren la conformación tridimensional, o de otra manera impacten adversamente la estabilidad, producción o procesamiento, o disminuyan la inmunogenicidad del antígeno. Los dominios F2 y F1 están colocados en una orientación N-terminal a C-terminal, diseñados para replicar el doblado y ensamble del análogo de proteína F en la conformación de prefusión madura. Para incrementar la producción, el dominio F2 puede ser precedido por un péptido de señal secretor, tal como un péptido de señal de proteína F nativo o un péptido de señal heterólogo escogido para incrementar la producción y secreción en las células hospederas en las cuales ha de ser expresado el antígeno PreF recombinante.

Los antígenos PreF son estabilizados (en la conformación de prefusión trimérica) al introducir una o más modificaciones, tales como la adición, deleción o sustitución, de uno o más aminoácidos. Una modificación estabilizadora de este tipo es la adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio estabilizador heterólogo. En modalidades ilustrativas,

el dominio estabilizador heterólogo es un dominio de multimerización de proteína. Un ejemplo particularmente favorable de dicho dominio de multimerización de proteína es un dominio de hélice enrollada, tal como un dominio de cremallera de isoleucina que promueve la trimerización de polipéptidos múltiples que tienen dicho dominio. Un dominio de cremallera de isoleucina ilustrativo se ilustra en SEQ ID NO:11. Típicamente, el dominio estabilizador heterólogo está colocado C-terminal al dominio F1.

Opcionalmente, el dominio de multimerización es conectado al dominio F1 por medio de una secuencia enlazadora de aminoácidos corta, tal como la secuencia GG. El enlazador también puede ser un enlazador más largo (por ejemplo, que incluye la secuencia GG, tal como la secuencia de aminoácidos: GGS GGS GGS; SEQ ID NO: 14). En la técnica se conocen numerosos enlazadores conformacionalmente neutros que se pueden usar en este contexto sin alterar la conformación del antígeno PreF.

Otra modificación de estabilización es la eliminación de un sitio de reconocimiento de furina y sitio de digestión que está localizado entre los dominios F2 y F1 en la proteína F0 nativa. Uno o ambos sitios de reconocimiento de furina, ubicados en las posiciones 105-109 y en las posiciones 133-136 pueden ser eliminados al deletar, o sustituir uno o más aminoácidos de los sitios de reconocimiento de furina, de tal manera que la proteasa es incapaz de digerir el polipéptido PreF en sus dominios constituyentes. Opcionalmente, el péptido pep27 intermedio también puede ser removido o sustituido v.gr., por un péptido enlazador. Además, u

opcionalmente, un sitio de no digestión de furina (v.gr., un sitio de metaloproteinasa en las posiciones 112-113) en proximidad al péptido de fusión puede ser removido o sustituido.

Otro ejemplo de una mutación estabilizadora es la adición o sustitución de un aminoácido hidrofílico en un dominio hidrofóbico de la proteína F. Típicamente, un aminoácido cargado, tal como lisina, se añadirá o sustituirá a un residuo neutro, tal como leucina, en la región hidrofóbica. Por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico se puede añadir a, o sustituir a, un aminoácido hidrofóbico o neutro dentro de dominio de hélice enrollada de HRB del dominio extracelular de la proteína F. A manera de ejemplo, un residuo de aminoácido cargado, tal como lisina, puede sustituir a la leucina presente en la posición 512 de la proteína F. Alternativamente, o además, un aminoácido hidrofílico se puede añadir o puede sustituir a un aminoácido hidrofóbico o neutro dentro del dominio HRA de la proteína F. Por ejemplo, uno o más aminoácidos cargados, tales como lisina, pueden ser insertados en o ceca de la posición 105-106 (v.gr., después del aminoácido correspondiente al residuo 105 de SEQ ID NO:2 de referencia, tal como entre los aminoácidos 105 y 106) del antígeno PreF. Opcionalmente, los aminoácidos hidrofílicos pueden ser añadidos o sustituir a los dominios HRA y HRB. Alternativamente, uno o más residuos hidrofóbicos pueden ser deletados, siempre que la conformación global del antígeno PreF no sea adversamente impactada.

Además o alternativamente, se pueden hacer una o más modificaciones, que alteran el estado de glicosilación del antígeno PreF. Por

ejemplo, uno o más aminoácidos en un sitio de glicosilación presente en una proteína F de RSV nativa, v.gr., en o alrededor del residuo de aminoácido 500 (en comparación con SEQ ID NO:2) puede ser deletado o sustituido (o un aminoácido se puede añadir de tal manera que el sitio de glicosilación es alterado) para incrementar o disminuir el estado de glicosilación del antígeno PreF. Por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 500-502 de SEQ ID NO:2 se pueden seleccionar de: NGS; NKS; NGT; y NKT. Por lo tanto, en ciertas modalidades, los antígenos PreF incluyen un polipéptido de proteína F soluble que comprende un dominio F2 (v.gr., correspondiente a los aminoácidos 26-105 de SEQ ID NO:2) y un dominio F1 (v.gr., correspondiente a los aminoácidos 137-516 de SEQ ID NO:2) de un polipéptido de proteína F de RSV, en el cual se ha introducido por lo menos una modificación que altera la glicosilación. El antígeno PreF de RSV, por lo general incluye un péptido de fusión intacto entre el dominio F2 y el dominio F1. Opcionalmente, el antígeno PreF incluye un péptido de señal.

Como se describió antes, dichos polipéptidos de proteína F pueden incluir por lo menos una modificación seleccionada de: (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo (tal como un dominio de cremallera de isoleucina); (ii) una delección de por lo menos un sitio de digestión de furina; (iii) una delección de por lo menos un sitio de digestión no de furina; (iv) una delección de uno o más aminoácidos del dominio pep27; y (v) por lo menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrofílico en un dominio hidrofóbico del dominio

extracelular de proteína F. Como se describió antes, dichos antígenos PreF de RSV modificados por glicosilación se ensamblan en multímeros, v.gr., trímeros.

En modalidades ilustrativas, los antígenos PreF de RSV modificados por glicosilación se seleccionan del grupo de: a) un polipéptido que comprende o que consiste de SEQ ID NO:22; b) un polipéptido codificado por SEQ ID NO:21 o por una secuencia de polinucleótidos que hibrida bajo condiciones astringentes sustancialmente sobre su longitud entera a SEQ ID NO:21; c) un polipéptido con por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:22.

Cualquiera y/o todas las modificaciones estabilizadoras se pueden usar individualmente y/o en combinación con cualquiera de otras modificaciones estabilizadoras descritas aquí para producir un antígeno PreF. En otras modalidades ilustrativas, la proteína PreF que comprende un polipéptido que comprende un dominio F2 y un dominio F1 sin un sitio de digestión de furina intermedio entre el dominio F2 y el dominio F1, y con un dominio estabilizador heterólogo (v.gr., dominio de trimerización) ubicó la C-terminal al dominio F1. En ciertas modalidades, el antígeno PreF también incluye una o más adiciones y/o sustituciones de un residuo hidrofílico en un dominio HRA y/o HRB hidrofóbico. Opcionalmente, el antígeno PreF tiene una modificación de por lo menos un sitio de no digestión de furina, tal como un sitio de metaloproteinasa.

Un antígeno PreF opcionalmente puede incluir un componente

de polipéptido adicional que incluye por lo menos una porción inmunogénica de la proteína G de RSV. Es decir, en ciertas modalidades, el antígeno PreF es una proteína quimérica que incluye tanto un componente de proteína F como un componente de proteína G. El componente de proteína F puede ser

5 cualquiera de los antígenos PreF descritos anteriormente, y el componente de proteína G se selecciona para ser una porción inmunológicamente activa de proteína G de RSV (hasta y/o incluyendo una proteína G de longitud completa). En modalidades ilustrativas, el polipéptido de proteína G incluye los aminoácidos 149-229 de una proteína G (en donde las posiciones de

10 aminoácidos están diseñadas con referencia a la secuencia de proteína G representada en SEQ ID NO:4). Un experto en la técnica apreciará que se puede usar una porción o fragmento más pequeño de la proteína G, siempre que la porción seleccionada retenga las características inmunológicas dominantes del fragmento de proteína G más grande. En particular, el

15 fragmento seleccionado retiene el epítipo inmunológicamente dominante entre aproximadamente las posiciones de aminoácido 184-198 (v.gr., aminoácidos 180-200), y es suficientemente largo para doblarse y ensamblarse en una conformación estable que presenta el epítipo inmunodominante. Se pueden usar fragmentos más largos, v.gr., desde

20 aproximadamente el aminoácido 128 hasta aproximadamente el aminoácido 229, hasta proteína G de longitud completa, siempre que el fragmento seleccionado se doble en una conformación estable en el contexto de la proteína quimérica, no interfiera con la producción, procesamiento o

estabilidad cuando se produce de manera recombinante en células
 hospederas. Opcionalmente, el componente de proteína G es conectado al
 componente de proteína F por medio de una secuencia de enlazador de
 aminoácidos corta, tal como la secuencia GG. El enlazador también puede ser
 5 un enlazador más largo (tal como la secuencia de aminoácidos:
 GGSGGSGGS: SEQ ID NO:14). En la técnica se conocen numerosos
 enlazadores conformacionalmente neutros que se pueden usar en este
 contexto sin alterar la conformación del antígeno PreF.

Opcionalmente, el componente de proteína G puede incluir una
 10 o más sustituciones de aminoácido que recude o previene enfermedad viral
 incrementada en un modelo animal de enfermedad de RSV. Es decir, la
 proteína G puede incluir una sustitución de aminoácidos, tal como cuando una
 composición inmunogénica que incluye antígenos quiméricos PreF-G se
 administra a un sujeto seleccionado de un modelo animal aceptado (v.gr.,
 15 modelo de ratón de RSV), el sujeto presenta síntomas reducidos o no
 presenta ningún síntoma de enfermedad viral incrementado por vacuna (v.gr.,
 eosinofilia, neutrofilia), en comparación con un animal de control que recibe
 una vacuna incluyendo aquel que contiene una proteína G no modificada. La
 reducción y/o prevención de enfermedad viral incrementada por vacuna puede
 20 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 inductor de Th1 fuerte). Además, la
 sustitución de aminoácidos puede reducir o prevenir enfermedad viral

incrementada por vacuna cuando se administra a un sujeto humano. Un ejemplo de una sustitución de aminoácidos adecuada es el reemplazo de asparagina en la posición 191 por una alanina (Asn → Ala en el aminoácido 191: N191A).

- 5 Opcionalmente, cualquier antígeno PreF descrito anteriormente puede incluir una secuencia adicional que sirve como auxiliar a la purificación. Un ejemplo, es una etiqueta de polihistidina. Dicha etiqueta puede ser removida del producto final si se desea.

- 10 Cuando se expresan, los antígenos PreF sufren doblez y ensamble intramoleculares en la proteína madura que incluye un multímero de polipéptidos. Favorablemente, los polipéptidos de antígeno preF se ensamblan en un trímero que se asemeja a la conformación de prefusión de la proteína F de RSV madura, procesada.

- 15 Cualquiera de los antígenos PreF (incluyendo los antígenos PreF-G) descritos aquí se puede usar favorablemente en composiciones inmunogénicas para el propósito de producir una respuesta inmunológica protectora contra RSV. Dichas composiciones inmunogénicas típicamente incluyen un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un regulador de pH. Para incrementar la respuesta inmunológica producida
20 después de la administración, la composición inmunogénica por lo general también incluye un adyuvante. En el caso de composiciones inmunogénicas para producir una respuesta inmunológica protectora contra RSV (v.gr., vacunas), las composiciones favorablemente incluyen un adyuvante que

predominantemente produce una respuesta inmunológica Th1 (un adyuvante de desviación de Th1). Típicamente, el adyuvante se selecciona para ser adecuado para administración a la población objetivo a la se ha de administrar cual la composición. Por lo tanto, dependiendo de la aplicación, el adyuvante
5 se selecciona para ser adecuado para administración, v.gr., a neonatos o a personas de edad avanzada.

Las composiciones inmunogénicas descritas aquí son favorablemente utilizadas como vacunas para la reducción o prevención de infección con RSV, sin inducir una respuesta inmunológica (tal como
10 enfermedad viral incrementada por vacuna) después de la administración o exposición a RSV.

En algunas modalidades, la composición inmunogénica incluye un antígeno PreF (tal como la modalidad ilustrativa ilustrada por SEQ ID NO:6) y un segundo polipéptido que incluye un componente de proteína G. El
15 componente de proteína G típicamente incluye por lo menos los aminoácidos 149-229 de una proteína G. Aunque se pueden usar porciones más pequeñas de las proteína G, dichos fragmentos deberán incluir, cuando menos, el epítipo dominante inmunológico de los aminoácidos 184-198. Alternativamente, la proteína G puede incluir una porción más grande de la
20 proteína G, tal como los aminoácidos 128-229 ó 130-230, opcionalmente como un elemento de una proteína más grande, tal como una proteína G de longitud completa, o un polipéptido quimérico.

En otras modalidades, la composición inmunogénica incluye un

antígeno PreF que es una proteína quimérica que también incluye un componente de proteína G (tal como las modalidades ilustrativas ilustradas por SEQ ID NOs: 8 y 10). El componente de proteína G de dicho antígeno PreF quimérico (o PreF-G) típicamente incluye por lo menos los aminoácidos 149-229 de una proteína G. Como se indicó antes, también se pueden usar fragmentos más pequeños o más grandes (tales como los aminoácidos 129-229 ó 130-230) de la proteína G, siempre que los epítopes inmunodominantes sean retenidos, y la conformación del antígeno PreF-G no sea impactada de manera adversa.

10 Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también pueden incluir por lo menos un antígeno adicional de un organismo patogénico distinto a RSV. Por ejemplo, el organismo patogénico es un virus distinto a RSV, tal como virus de parainfluenza (PIV), sarampión, hepatitis B, virus de polio, o virus de la influenza. Alternativamente, el organismo
15 patogénico puede ser una bacteria tal como difteria, tétanos, pertussis, *Haemophilus influenzae*, y *Pneumococcus*.

 Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican cualquiera de los antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G) también son una característica de esta descripción. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico que codifica el antígeno PreF del ácido
20 nucleico es optimizada para expresión en un hospedero 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 procarióticos y eucarióticos) son una característica de esta descripción. Asimismo, las células hospederas que incluyen dichos ácidos nucleicos, y vectores, son una característica de esta descripción. Dichos ácidos nucleicos también se pueden usar en el contexto de

5 composiciones inmunogénicas para administrarse a un sujeto para producir una respuesta inmunológica específica para RSV.

Los antígenos PreF se usan favorablemente para la prevención y/o tratamiento de infección por RSV. Por lo tanto, otro aspecto de esta descripción se refiere a un método para producir una respuesta inmunológica

10 contra RSV. El método implica administrar una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que contiene antígeno PreF a un sujeto (tal como un sujeto humano o animal). La administración de una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición produce una respuesta inmunológica específica para epítopes presentes en el antígeno PreF. Dicha

15 respuesta inmunológica puede incluir respuestas de células B (v.gr., la producción de anticuerpos neutralizantes) y/o respuestas de células T (v.gr., la producción de citocinas). Favorablemente, la respuesta inmunológica producida por el antígeno PreF incluye elementos que son específicos para por lo menos un epítipo conformacional presente en la conformación de

20 prefusión de proteína F de RSV. Los antígenos PreF y composiciones pueden ser administrados a un sujeto sin incrementar la enfermedad viral después del contacto con RSV. Favorablemente, los antígenos PreF descritos aquí y composiciones inmunogénicas adecuadamente formuladas producen una

respuesta inmunológica derivada por Th1 que reduce o previene la infección con RSV y/o reduce o previene una respuesta patológica después de infección con un RSV.

Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar por medio de una variedad de vías, que incluyen vías tales como intranasal, que colocan directamente el antígeno Pref en contacto con la mucosa del tracto respiratorio superior. Alternativamente, se pueden utilizar vías de administración más tradicionales, tales como la vía de administración intramuscular.

Por lo tanto, también se contempla el uso de cualquiera de los antígenos (o ácidos nucleicos) de RSV descritos en la preparación de un medicamento para tratar infección por RSV (por ejemplo, tratamiento o prevención profiláctica de una infección por RSV). Por consiguiente, esta descripción provee los antígenos de RSV recombinantes descritos de las composiciones inmunogénicas para usarse en medicina, así como el uso de las mismas para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con RSV.

Detalles adicionales con respecto a antígenos PreF y métodos el uso de los mismos, están presentes en la descripción y los ejemplos siguientes.

Términos

A fin de facilitar la revisión de diversas modalidades de esta

descripción, se proveen las siguientes explicaciones de términos. Términos y explicaciones adicionales se pueden proveer en el contexto de esta descripción.

A menos que se explique de otra manera, todos los términos
5 técnicos y científicos usados aquí tiene el mismo significado que es
comúnmente entendido por un experto en la técnica al cual está dirigida esta
descripción. Definiciones de términos comunes en biología molecular se
pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicada por Oxford
University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The*
10 *Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994
(ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and*
Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicada por VCH
Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes
15 plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De manera
similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique
claramente otra cosa. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Cabe
entender además que todos los tamaños de bases o tamaños de
aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados
20 para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proveen para
descripción. Además, limitaciones numéricas dadas con respecto a
concentraciones o niveles de un sustrato, tales como un antígeno, se pretende
que sean aproximados. Por lo tanto, en donde una concentración es indicada

para ser por lo menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que la concentración se entienda para ser de aproximadamente (o "de alrededor de" o "~") 200 pg.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden usar en la práctica o prueba de esta descripción, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. El término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un compuesto o composición indicado (v.gr., ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o paso, o grupo de compuestos o pasos, pero no a la exclusión de ningún otro compuesto, composición, paso o grupo de los mismos. La abreviatura "v.gr.," se deriva del latín *verbi gratia*, y se usa aquí para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto, la abreviatura "v.gr." es sinónimo del término "por ejemplo".

El virus de sincicio respiratorio (RSV) es un virus patogénico de la familia Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género Pneumovirus. El genoma de RSV es una molécula de ARN de sentido negativo, que codifica 11 proteínas. La asociación apretada del genoma de ARN con la proteína N viral forma una nucleocápside envuelta dentro de la envoltura viral. Se han descrito dos grupos de cepas de RSV humano, los grupos A y B, con base en diferencias en antigenicidad de la glicoproteína G. Numerosas cepas de RSV se han aislado hasta la fecha. Las cepas ilustrativas indicadas por el número de acceso a GenBank y/o EMBL se pueden encontrar en el documento

WO2008114149, que se incorpora aquí por referencia para el propósito de describir las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de proteínas F y G de RSV adecuadas para usarse en antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G quiméricos), y en combinaciones con antígenos PreF. Cepas adicionales de RSV probablemente han de ser aisladas, y son abarcadas dentro del género de RSV. De manera similar, el género de RSV abarca variantes que se producen a partir de cepas que ocurren naturalmente (v.gr., cepas previamente o subsecuentemente identificadas) por deriva génica, o síntesis artificial y/o recombinación.

10 El término "proteína F" o "proteína de fusión" o "polipéptido de proteína F" o "polipéptido de proteína de fusión" se refiere a un polipéptido o proteína que tiene toda o una parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de proteína de fusión de RSV. De manera similar, el término "proteína G" o "polipéptido de proteína G" se refiere a un polipéptido o
15 proteína que tiene toda o parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de proteína de unión de RSV. Numerosas proteínas de fusión y unión de RSV han sido descritas y son conocidas por los expertos en la técnica. WO2008114149 establece variantes de proteína F y G ilustrativas (por ejemplo, variantes que ocurren naturalmente) públicamente disponibles
20 como de la fecha de presentación de esta descripción.

Una "variante", cuando se refiere a un ácido nucleico o polipéptido (v.gr., un ácido nucleico o polipéptido de proteína F o G de RSV, o un ácido nucleico o polipéptido PreF), es un ácido nucleico o un polipéptido

que difiere de un ácido nucleico o polipéptido de referencia. Usualmente, la diferencia(s) entre la variante y el ácido nucleico o polipéptido de referencia constituye un número proporcionalmente pequeño de diferencias en comparación con el referente.

5 Un "dominio" de un polipéptido o proteína es un elemento estructuralmente definido dentro del polipéptido o proteína. Por ejemplo, un "dominio de trimerización" es una secuencia de aminoácidos dentro de un polipéptido que promueve el ensamble del polipéptido en trimeros. Por ejemplo, un dominio de trimerización puede promover el ensamble en trimeros
10 mediante asociaciones con otros dominios de trimerización (de polipéptidos adicionales con la misma o diferente secuencia de aminoácidos). El término también se usa para referirse a un polinucleótido que codifica dicho péptido o polipéptido.

 Los términos "nativo" y "que ocurre naturalmente" se refieren a
15 un elemento, tal como una proteína, polipéptido o ácido nucleico que está presente en el mismo estado como en la naturaleza. Es decir, el elemento no ha sido modificado artificialmente. Se entenderá que, en el contexto de la descripción, hay numerosas variantes nativas/que ocurren naturalmente de proteínas o polipéptidos de RSV, v.gr., obtenidas de diferentes cepas que
20 ocurren naturalmente o aislados de RSV.

 El término "polipéptido" se refiere a un polímero en el cual los monómeros son residuos de aminoácidos que son unidos entre sí a través de enlaces de amida. Los términos "polipéptido" o "proteína", como se usa aquí,

se pretende que abarquen cualquier secuencia de aminoácidos y que incluyan secuencias modificadas tales como glicoproteínas. Se pretende específicamente que el término "polipéptido" cubra proteínas que ocurren naturalmente, así como aquellas que son producidas recombinantemente o
5 sintéticamente. El término "fragmento" en referencia a un polipéptido, se refiere a una porción (es decir, una subsecuencia) de un polipéptido. El término "fragmento inmunogénico" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que retienen por lo menos un epítipo inmunogénico predominante de proteína o polipéptido de referencia de longitud completa. La orientación
10 dentro de un polipéptido es generalmente mencionada en una dirección N-terminal a C-terminal, definida por la orientación de las porciones amino y carboxi de aminoácidos individuales. Los polipéptidos son traducidos a partir del N-terminal o amino-terminal hacia el C-terminal o carboxi-terminal.

Un "péptido de señal" es una secuencia de aminoácidos corta
15 (v.gr., aproximadamente 18-25 aminoácidos de longitud) que dirige proteínas secretoras o de membrana recién sintetizadas a y a través de membranas, v.gr., del retículo endoplásmico. Los péptidos de señal son frecuentemente pero no universalmente ubicados en el N-terminal de un polipéptido y son frecuentemente digeridos por peptidasas de señal después de que la proteína
20 ha cruzado la membrana. Las secuencias de señal típicamente contienen tres características estructurales comunes: una región básica polar N-terminal (n-región), un núcleo hidrofóbico, y una región c-hidrofílica).

Los términos "polinucleótido" y "secuencia de ácido nucleico" se

refieren a una forma polimérica de nucleótidos por lo menos de 10 bases de longitud. 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 entiende un

5 polinucleótido que no es inmediatamente contiguo con ambas de las secuencias codificantes y que es inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y el otro en el extremo 3') en el genoma que ocurre naturalmente del organismo del cual se deriva. En una modalidad, un polinucleótido codifica un polipéptido. La dirección 5' y 3' de un ácido nucleico se define por referencia a

10 la conectividad de unidades de nucleótido individuales y diseñadas de conformidad con las posiciones de carbono del anillo de azúcar de desoxirribosa (o ribosa). El contenido de información (codificante) de una secuencia de polinucleótidos se lee en una dirección 5' a 3'.

Un ácido nucleico "recombinante" es uno que tiene una

15 secuencia que no está ocurriendo naturalmente o tiene una secuencia que está hecha por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otra manera separados. Esta combinación artificial se puede lograr mediante síntesis química o, muy comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, v.gr., mediante técnicas de

20 ingeniería genética. Una proteína "recombinante" es una que es codificada por un ácido nucleico heterólogo (v.gr., recombinante), que ha sido introducido en una célula hospedero, tal como una célula bacteriana o eucariótica. El ácido nucleico puede ser introducido, en un vector de expresión que tiene señales

capaces de expresar la proteína codificada por el ácido nucleico introducido o el ácido nucleico puede ser integrado en el cromosoma de la célula hospedera.

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

10 El término "purificación" (v.gr., con respecto a un patógeno o una composición que contiene un patógeno) se refiere al procedimiento de remover componentes de una composición, cuya presencia no se desea. La purificación es un término relativo, y no requiere que todas las trazas del componente no deseable sean removidas de la composición. En el contexto de producción de vacunas, la producción incluye procedimientos tales como centrifugación, dialización, cromatografía de intercambio de iones y 15 cromatografía de exclusión de tamaño, purificación de afinidad o precipitación. Por lo tanto, el término "purificado" no requiere pureza absoluta, más bien, se pretende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de ácido nucleico purificado es una en la cual la proteína especificada es más enriquecida que el ácido nucleico es en su ambiente generador, por ejemplo 20 dentro de una célula o en una cámara de reacción bioquímica. Una preparación de ácido nucleico o proteína sustancialmente puro puede ser purificado de tal manera que el ácido nucleico deseado represente por lo menos 50% del contenido total de ácido nucleico de la preparación. En ciertas

modalidades, un ácido nucleico sustancialmente puro representa por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, o por lo menos 95% o más del contenido de ácido nucleico o proteína total de la preparación.

5 Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína u organelo) ha sido sustancialmente separado o purificado lejos de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la cual el componente ocurre naturalmente, tal como otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y organelos. Los ácidos
10 nucleicos y proteínas que ha sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas por métodos de purificación estándares. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedera así como ácidos nucleicos y proteínas químicamente sintetizados.

15 Un "antígeno" es un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos y/o una respuesta de células T en un animal, incluyendo composiciones que son inyectadas, absorbidas o de otra manera introducidas en un animal. El término "antígeno" incluye todos los epítopes antigénicos relacionados. El término "epítope" o "determinante
20 antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al cual responden las células B y/o T. Los "epítopes antigénicos dominantes" o "epítope dominante" son aquellos epítopes a los cuales se hace una respuesta inmunológica del hospedero funcionalmente significativa, v.gr., una respuesta de anticuerpo o

una respuesta de células T. Por lo tanto, con respecto a una respuesta inmunológica protectora contra un patógeno, los epítopes antigénicos dominantes son aquellas porciones antigénicas que cuando son reconocidas por el sistema inmunológico del hospedero dan por resultado protección
5 contra enfermedad causada por el patógeno. El término "epítotope de células T" se refiere a un epítotope que cuando es unido a una molécula de MHC apropiada es específicamente unido por una célula T (mediante un receptor de célula T). Un "epítotope de célula B" es especialmente unido por un anticuerpo (o una molécula receptora de célula B).

10 Un "adyuvante" es un agente que incrementa la producción de una respuesta inmune de una manera no específica. Los adyuvantes comunes incluyen suspensiones de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) sobre el cual el antígeno es adsorbido; emulsiones, incluyendo agua en aceite y aceite en agua (y variantes de las mismas,
15 incluyendo emulsiones dobles y emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas de receptor de tipo Toll (particularmente, agonistas de TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9), y varias combinaciones de esos componentes.

20 Una "composición inmunogénica" es una composición de material adecuado para administrarse a un sujeto humano o animal (v.gr., con ambiente experimental) que es capaz de producir una respuesta inmunológica específica, v.gr., contra un patógeno, tal como RSV. Como tal, una

composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, antígenos de polipéptido) o epítopes antigénicos. Una composición inmunogénica también puede incluir uno o más componentes adicionales capaces de producir o incrementar una respuesta inmunológica, tal como un
5 excipiente, vehículo y/o adyuvante. En ciertos casos, las composiciones inmunogénicas se administran para producir una respuesta inmunológica que proteja al sujeto contra síntomas o condiciones inducidas por un patógeno. En algunos casos, los síntomas o enfermedad causada por un patógeno es prevenida (o reducida o mitigada) al inhibir la replicación del patógeno (v.gr.,
10 RSV) después de la exposición del sujeto al patógeno. En este contexto de la descripción, el término composición inmunogénica se entenderá que abarca composiciones que están diseñadas para administrarse a un sujeto o población de sujetos para el propósito de producir una respuesta inmunológica protectora o paliativa contra RSV (es decir, composiciones de vacuna o
15 vacunas).

Una "respuesta inmunológica" es una respuesta de una célula del sistema inmunológico, tal como una célula B, c B, célula T o monocito, a un estímulo. Una respuesta inmunológica puede ser una respuesta de células B, que dé por resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como
20 anticuerpos neutralizantes específicos de antígeno. Una respuesta inmunológica también puede ser una respuesta de células T, tal como una respuesta de CD4+ o una respuesta de CD8+. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno particular (es decir, una "respuesta específica

de antígenos"). Si el antígeno es derivado de un patógeno, la respuesta específica de antígeno es una "respuesta específica de patógeno". Una "respuesta inmunológica protectora" es una respuesta inmunológica que inhibe una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce infección por un patógeno o disminuye los síntomas (incluyendo la muerte) que resulta de infección por el patógeno. Una respuesta inmunológica protectora se puede medir, por ejemplo, mediante la inhibición de duplicación viral o formación de placa en un ensayo de reducción de placa o ensayo de neutralización-ELISA, o midiendo la resistencia a desafío de patógeno *in vivo*.

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

15 Una "cantidad inmunológicamente efectiva" es una cantidad de una composición (típicamente, una composición inmunogénica) usada para producir una respuesta inmunológica es un sujeto a la composición o a un antígeno en la composición. Comúnmente, el resultado deseado es la producción de una respuesta inmunológica específica de antígeno (v.gr., patógeno) que es capaz de o contribuye a proteger al sujeto contra el patógeno. Sin embargo, para obtener una respuesta inmunológica protectora contra un patógeno puede requerir múltiples administraciones de la composición inmunogénica. Por lo tanto, en el contexto de esta descripción, el

término cantidad inmunológicamente efectiva abarca una dosis fraccionada que contribuye en combinación con administraciones previas o subsecuentes a lograr una respuesta inmunológica protectora.

El adjetivo "farmacéuticamente aceptable" indica que el referente
5 es adecuado para administrarse a un sujeto (v.gr., un sujeto humano o animal). Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15a Edición (1975), describe composiciones y formulaciones (incluyendo diluyentes) adecuados para suministro farmacéutico de composiciones terapéuticas y/o profilácticas, incluyendo
10 composiciones inmunogénicas.

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

El término "reduce" es un término relativo, de tal manera que un agente reduce una respuesta o condición si la respuesta o condición es
20 cuantitativamente disminuida después de la administración del agente, o es disminuida después de la administración del agente, en comparación con un agente de referencia. De manera similar, el término "previene" no necesariamente significa que un agente elimina completamente la respuesta o

condición, siempre que por lo menos una característica de la respuesta o condición sea eliminada. Por lo tanto, una composición inmunogénica que reduce o previene una infección o una respuesta, tal como una respuesta patológica, v.gr., enfermedad viral incrementada por vacuna, puede pero no necesariamente elimina por completo dicha infección o respuesta, siempre que la infección o respuesta sea mediblemente disminuida, por ejemplo, por lo menos por aproximadamente 50%, tal como por lo menos por aproximadamente 70%, o aproximadamente 80%, o incluso por aproximadamente 90% de (es decir a 10% o menos de) la infección o respuesta en ausencia del agente, o en comparación con un agente de referencia.

Un "sujeto" es un organismo vertebrado multicelular vivo. En el contexto de esta descripción, el sujeto puede ser un sujeto experimental, tal como un animal no humano, v.gr., un ratón, una rata algodónera o un primate no humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un sujeto humano.

Antígenos PreF

En la naturaleza, la proteína F de RSV se expresa como un precursor de polipéptido individual de 574 aminoácidos de longitud, designado F0. *In vivo*, F0 oligomeriza en el retículo endoplásmico y es proteolíticamente procesado por una furina proteasa en dos secuencias de consenso de furina conservadas (sitios de digestión de furina), RARR¹⁰⁹ (SEQ ID NO: 15) y RKRR¹³⁶ (SEQ ID NO: 16) para generar un oligómero que consiste de dos

fragmentos ligados a disulfuro. El más pequeño de esos fragmentos se denomina F2 y se origina a partir de la porción N-terminal del precursor F0. Los expertos en la técnica reconocerán que las abreviaturas F0-, F1 y F2 son comúnmente designadas F₀, F₁ y F₂ en la literatura científica. El fragmento F1

5 C-terminal más grande es anclado a la proteína F en la membrana mediante una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos, que son adyacentes a una cola citoplásmica de 24 aminoácidos. Tres dímeros F2-F1 se asocian para formar una proteína F madura, que adopta una conformación prefusogénica ("prefusión") metaestable que es disparada para sufrir un cambio

10 conformacional al contacto con una membrana celular objetivo. Este cambio conformacional expone una secuencia hidrofóbica, conocida como el péptido de fusión, que se asocia con la membrana de la célula hospedera y promueve fusión de la membrana del virus, o una célula infectada con la membrana celular objetivo.

15 El fragmento F1 contiene por los menos dos dominios de repetición de héptadas, designados HRA y HRB, y situados en proximidad al péptido de fusión y dominios de anclaje de transmembrana, respectivamente. En la conformación de prefusión, el dímero F2-F1 forma una cabeza globular y una estructura de pedúnculo, en la cual los dominios de HRA están en

20 conformación segmentada (extendida) en la cabeza globular. Por el contrario, los dominios de HRB forman un pedúnculo de hélice enrollada de tres cadenas que se extiende desde la región de cabeza. Durante la transición de la prefusión a las conformaciones de postfusión, los dominios de HRA se

colapsan y son llevados a proximidad a los dominios de HRB para formar un paquete de seis hélices antiparalelas. En el estado de postfusión, el péptido de fusión y dominios de transmembrana son yuxtapuestos para facilitar la fusión de membrana.

- 5 Aunque la descripción conformacional provista anteriormente se basa en modelado molecular de datos cristalográficos, las distinciones estructurales entre las conformaciones de prefusión y postfusión pueden ser monitoreadas sin recurrir a cristalografía. Por ejemplo, se puede usar micrografía electrónica para distinguir entre las conformaciones de prefusión y
- 10 postfusión (alternativamente designadas prefusogénica y fusogénica), como lo demuestra Calder *et al*, *Virology*, 271:122-131 (2000) y Morton *et al*, *Virology*, 311:275-288, que se incorpora aquí por referencia para el propósito de enseñanzas tecnológicas. La conformación de prefusión también se puede distinguir a partir de la conformación fusogénica (postfusión) mediante
- 15 ensayos de asociación de liposoma como lo describe Connolly *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:17903-17908 (2006), que también se incorpora aquí por referencia para el propósito de sus enseñanzas tecnológicas. Además, las conformaciones de prefusión y fusogénica se pueden distinguir usando anticuerpos (v.gr., anticuerpos monoclonales) que reconocen específicamente
- 20 epítopes de conformación presentes en uno o el otro de la forma de prefusión o fusogénica de la proteína F de RSV, pero no sobre la otra forma. Los epítopes de conformación se pueden deber a exposición preferencial de un determinante antigénico sobre la superficie de la molécula. Alternativamente,

103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

epítopes conformacionales pueden producirse a partir de la yuxtaposición de aminoácidos que son no contiguos en el polipéptido lineal.

Los antígenos PreF descritos aquí están diseñados para estabilizar y mantener la conformación de prefusión de la proteína F de RSV, de tal manera que en una población de proteína expresada, una porción sustancial de la población de proteína expresada está en la conformación prefusogénica (prefusión) (v.gr., como se predice por modelado estructural y/o termodinámico o como es evaluado por uno o más de los métodos descritos anteriormente). Modificaciones estabilizadoras son introducidas en una proteína F nativa (o sintética), tal como la proteína F ilustrativa de SEQ ID NO:2, de tal manera que los epítopes inmunogénicos mayores de la conformación de prefusión de la proteína F se mantienen después de la introducción del antígeno PreF en un ambiente celular o extracelular (por ejemplo, *in vivo*, v.gr., después de la administración a un sujeto).

Primero, un dominio de estabilización heterólogo se puede colocar en el extremo C-terminal de la construcción para reemplazar el dominio de anclaje de membrana del polipéptido F0. Este dominio estabilizador se predice que compensa para la inestabilidad de HRB, ayudando a estabilizar al conformador de prefusión. En modalidades ilustrativas, el dominio de estabilización heterólogo es un dominio de multimerización de proteína. Un ejemplo particularmente favorable de dicho dominio de multimerización de proteína es un dominio de trimerización. Los dominios de trimerización ilustrativos se doblan en una hélice enrollada que

promueve el ensamble en trímeros de polipéptidos múltiples que tienen dichos dominios de hélice enrollada. Un ejemplo favorable de un dominio de trimerización es una cremallera de isoleucina. Un dominio de cremallera de isoleucina ilustrativo es la variante de isoleucina GCN4 de levadura genéticamente manipulada descrita por Harbury *et al.* *Science* 262:1401-1407 (1993). La secuencia de un dominio de cremallera de isoleucina adecuado está representado por SEQ ID NO:11, aunque variantes de esta secuencia que retienen la capacidad para formar un domino estabilizador de hélice enrollada son igualmente adecuados. Dominios de trimerización de hélice enrollada de estabilización alternativos incluyen: TRAF2 (No. de acceso a GENBANK® Q12933 [gi:23503103]; aminoácidos 299-348); Thrombospondin 1 (Acceso No. PO7996 [gi:135717]; aminoácidos 291-314); Matrilin-4 (Acceso No. O95460 [gi:14548117]; aminoácidos 594-618; CMP (matrilin-1) (Acceso No. NP_002370 [gi:4505111]; aminoácidos 463-496; HSF1 (Acceso No. AAX42211 [gi:61362386]; aminoácidos 165-191; y Cubilin (Acceso No. NP_001072 [gi:4557503]; aminoácidos 104-138. Se espera que un dominio de trimerización adecuado dé por resultado el ensamble de una porción sustancial de la proteína expresada en trímeros. Por ejemplo, por lo menos 50% de un polipéptido PreF recombinante que tiene un dominio de trimerización se ensamblará en un trímero (v.gr., como se evalúa por AFF-MALS). Típicamente, por lo menos 60%, muy favorablemente por lo menos 70%, y muy deseablemente por lo menos aproximadamente 75% o más del polipéptido expresado existe como un trímero.

A fin de estabilizar HRB aún más, el residuo de leucina ubicado en la posición 512 (en relación con la proteína F0 nativa) del PreF puede ser sustituido por una lisina (L482K del polipéptido de antígeno PreF de SEQ ID NO:6). La sustitución mejora la periodicidad del residuo hidrofóbico de hélice enrollada. De manera similar, una lisina se puede añadir después del aminoácido en la posición 105.

Segundo, pep27 puede ser removido. El análisis de un modelo estructural de proteína F de RSV en el estado de prefusión sugiere que pep27 genere un lazo no restringido grande entre F1 y F2. Este lazo no contribuye a estabilización del estado de prefusión, y es removido después de digestión de la proteína nativa por furina.

Tercero, uno o ambos motivos de digestión de furina pueden ser deletados. Con este diseño, el péptido de fusión no es digerido de F2, previniendo la liberación de la cabeza globular del conformador de prefusión y accesibilidad a membranas cercanas. Se predice la interacción entre el péptido de fusión y la interfaz de membrana, que es un problema mayor en la inestabilidad del estado de prefusión. Durante el proceso de fusión, la interacción entre el péptido de fusión y la membrana objetivo da por resultado la exposición del péptido de fusión desde el interior de la estructura de cabeza globular, incrementando la inestabilidad del estado de prefusión y doblez en el conformador de postfusión. Este cambio de conformación permite el procesamiento de fusión de membrana. La remoción de uno o ambos de los sitios de digestión de furina se predice que prevé la accesibilidad de

membrana a la parte N-terminal del péptido de fusión, estabilizando el estado de prefusión. Por lo tanto, en modalidades ilustrativas descritas aquí, la remoción de los motivos de digestión de furina da por resultado un antígeno PreF que comprende un péptido de fusión intacto, que no es digerido por furina durante o después del procesamiento y ensamble.

Opcionalmente, por lo menos un sitio de no digestión de furina puede ser removido, por ejemplo, por sustitución de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, la evidencia experimental sugiere que bajo condiciones que conducen a la digestión por ciertas metaloproteinasas, el antígeno PreF puede ser digerido en la vecindad de los aminoácidos 110-118 (por ejemplo, en donde la digestión ocurre entre los aminoácidos 112 y 113 del antígeno PreF; entre una leucina a la posición 142 y glicina en la posición 143 del polipéptido F de referencia de SEQ ID NO:2). Por consiguiente, la modificación de uno o más aminoácidos dentro de esta región puede reducir la digestión del antígeno PreF. Por ejemplo, la leucina en la posición 112 puede ser sustituida con un aminoácido diferente, tal como isoleucina o triptofano (como se muestra en la modalidad ilustrativa de SEQ ID NO:20). Alternativamente o adicionalmente, la glicina en la posición 113 puede ser sustituida por una serina o alanina.

Opcionalmente, un antígeno PreF puede incluir una o más modificaciones que alteran el patrón o estado de glicosilación (v.gr., al incrementar o disminuir la proporción de moléculas glicosiladas en uno o más de los sitios de glicosilación presentes en un polipéptido de proteína F nativo.

Por ejemplo, el polipéptido de proteína F nativo de SEQ ID NO:2 se predice que es glicosilado en las posiciones de aminoácido 27, 70 y 500 (correspondientes a las posiciones 27, 70 y 470 del antígeno PreF ilustrativo de SEQ ID NO:6). En una modalidad, una modificación es introducida en la vecindad del sitio de glicosilación en la posición de aminoácido 500 (designada N470). Por ejemplo, el sitio de glicosilación puede ser removido al sustituir un aminoácido, tal como glutamina (Q) en lugar de la asparagina en la posición 500 (de la secuencia de referencia, que corresponde por alineación a la posición 470 del antígeno PreF ilustrativo). Favorablemente, una modificación que incrementa la eficiencia de glicosilación en este sitio de glicosilación es introducida. Ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen en las posiciones 500-502, las siguientes secuencias de aminoácidos: NGS; NKS; NGT; NKT. De manera interesante, se ha encontrado que modificaciones de este sitio de glicosilación que dan por resultado glicosilación incrementada también dan por resultado la producción de PreF sustancialmente incrementada. Por lo tanto, en ciertas modalidades, el antígeno PreFs tiene un sitio de glicosilación modificado en la posición correspondiente al aminoácido 500 de la secuencia de PreF de referencia (SEQ ID NO:2), v.gr., en la posición 470 del antígeno PreF ilustrado por SEQ ID NO:6). Las modificaciones adecuadas incluyen las secuencias: NGS; NKS; NGT; NKT en aminoácidos correspondientes a las posiciones 500-502 de la secuencia de péptido de proteína F de referencia. El aminoácido de una modalidad ilustrativa que incluye una modificación de "NGT" se provee en

SEQ ID NO:18. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente modificaciones similares para modificaciones de NGS, NKS y NKT correspondientes. Dichas modificaciones son favorablemente combinadas con cualquiera de las mutaciones estabilizadoras descritas aquí (v.gr., una hélice enrollada heteróloga, tal como una cremallera de isoleucina, dominio y/o una modificación en una región hidrofóbica, y/o remoción de pep27, y/o de un sitio de digestión de furina, y/o remoción de un sitio de no digestión de furina, y/o remoción de un sitio de no digestión de furina). Por ejemplo, en una modalidad específica, el antígeno PreF incluye una sustitución que elimina un sitio de no digestión de furina y una modificación que incrementa la glicosilación. Una secuencia ilustrativa se provee en SEQ ID NO:22 (dicha modalidad ilustrativa incluye una modificación de "NGT" y la sustitución de glutamina en lugar de leucina en la posición 112).

De manera más general, cualquiera de las modificaciones estabilizadoras descritas aquí, v.gr., la adición de un dominio estabilizador heterólogo, tal como una hélice enrollada (por ejemplo, una cremallera de isoleucina dominio), preferiblemente situada en el extremo C-terminal del antígeno PreF soluble; modificación de un residuo, tal como leucina a lisina, en el dominio HRB hidrofóbico; remoción de pep27; remoción de uno o ambos motivos de digestión de furina; remoción de un sitio de no digestión de furina; y/o modificación de un sitio de glicosilación se puede utilizar en combinación con cualquiera o más (o hasta todos en cualquier combinación deseada) de las otras modificaciones estabilizadoras. Por ejemplo, una hélice enrollada

heteróloga (u otro dominio estabilizador heterólogo) se puede utilizar solo o en combinación con cualquiera de: una modificación en una región hidrofóbica, y/o remoción de pep27, y/o remoción de un sitio de digestión de furina, y/o remoción de un sitio de no digestión de furina, y/o remoción de un sitio de no digestión de furina. En ciertas modalidades específicas, el antígeno PreF incluye un dominio de hélice enrollada C-terminal (cremallera de isoleucina), una sustitución estabilizadora en el dominio hidrofóbico HRB, y remoción de uno o ambos sitios de digestión de furina. Dicha modalidad incluye un péptido de fusión intacto que no es removido por digestión de furina. En una modalidad específica, el antígeno PreF también incluye un sitio de glicosilación modificado en la posición de aminoácido 500.

El polipéptido de proteína F nativo se puede seleccionar de cualquier proteína F de una cepa RSV A o RSV B, o de variantes de las mismas (como se definió antes). En ciertas modalidades ilustrativas, el polipéptido de proteína F es la proteína F representada por SEQ ID NO: 2. Para facilitar el entendimiento de esta descripción, todas las posiciones de residuo de aminoácido, independientemente de la cepa, se dan con respecto a (es decir, la posición de residuo de aminoácido corresponde a) la posición del aminoácido de la proteína F ilustrativa. Las posiciones de aminoácido comparables de cualquier otra cepa de RSV A o B pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica alineando las secuencias de aminoácidos de la cepa de RSV seleccionada con la de la secuencia ilustrativa usando algoritmos de alineación fácilmente disponibles y bien

conocidos (tales como BLAST, v.gr., usando parámetros por omisión).
Numerosos ejemplos adicionales de polipéptidos de proteína F de diferentes
cepas de RSV se describe en el documento WO2008114149 (que se
incorpora aquí por referencia para los propósitos de proveer ejemplos
5 adicionales de secuencias de proteína F y G de RSV). Variantes adicionales
pueden producirse a través de deriva génica, o se pueden producir
artificialmente usando mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o por
recombinación de dos o más variantes pre-existentes. Dichas variantes
adicionales también son adecuadas en el contexto de antígenos PreF (y PreF-
10 G) descritos en la presente.

Al seleccionar los dominios F2 y F1 de la proteína F, un experto
en la técnica reconocerá que no es estrictamente necesario incluir el dominio
F2 y/o F1. Típicamente, consideraciones conformacionales son de importancia
cuando se selecciona una subsecuencia (o fragmento) del dominio F2. Por lo
15 tanto, el dominio F2 típicamente incluye una porción del dominio F2 que
facilita el ensamble y estabilidad del polipéptido. En ciertas variantes
ilustrativas, el dominio F2 incluye los aminoácidos 26-105. Sin embargo,
también son posibles variantes que tienen modificaciones menores en longitud
(mediante adición, o delección de uno o más aminoácidos).

20 Típicamente, por lo menos una subsecuencia (o fragmento) del
dominio F1 se selecciona y se diseña para mantener una conformación
estable que incluya epítopes inmunodominantes de la proteína F. Por ejemplo,
es generalmente deseable seleccionar una subsecuencia del dominio de

polipéptido F1 que incluya epítopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes en regiones de aminoácidos 262-275 (neutralización de palivizumab) y 423-436 (ch101F MAb de Centocor). Además, es deseable incluir epítopes de células T, v.gr., en la región de los aminoácidos 328-355, muy comúnmente, como una porción contigua individual de la subunidad F1 (v.gr., que abarca los aminoácidos 262-436) pero los epítopes podrían ser retenidos en una secuencia sintética que incluye esos epítopes inmunodominantes como elementos discontinuos ensamblados en una conformación estable. Por lo tanto, un polipéptido de dominio F1 comprende por lo menos aproximadamente los aminoácidos 262-436 de polipéptido de proteína F de RSV. En un ejemplo no limitante provisto aquí, el dominio F1 comprende los aminoácidos 137 a 516 de un polipéptido de proteína F nativo. Un experto en la técnica reconocerá que las subsecuencias más cortas adicionales se pueden usar a discreción del investigador.

15 Cuando se selecciona una subsecuencia del dominio F2 o F1 (o como se describirá más adelante con respecto al componente de proteína G de ciertos antígenos PreF-G), además de la consideración conformacional, puede ser deseable escoger secuencias (v.gr., variantes, subsecuencias y similares) con base en la inclusión de los epítopes inmunogénicos adicionales.

20 Por ejemplo, epítopes de células T adicionales pueden ser identificados usando motivos de anclaje u otros métodos, tales como determinaciones de red neural o polinomiales, conocidas en la técnica, véase, v.gr., RANKPEP (disponible en la red en: mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html); ProPredl

(disponible en la red en: imtech.res.in/raghava/propred1/index.html); Bimas (disponible en la red en: www-bimas.dcrtnih.gov/molbi/hla_bind/index.html); y SYFPEITH (disponible en la red en: Syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm). Por ejemplo, los algoritmos se usan para

5 determinar el "umbral de unión" de los péptidos, y para seleccionar aquellos con puntuaciones que les dan una alta probabilidad de unión a MHC o anticuerpo a una cierta afinidad. Los algoritmos se basan ya sea en los efectos de unión a MHC de un aminoácido particular en una posición particular, los efectos sobre la unión a anticuerpo de un aminoácido particular

10 en una posición particular, o los efectos sobre la unión de una sustitución particular en un péptido que contiene un motivo. Dentro del contexto de un péptido inmunogénico, un "residuo conservado" es uno que aparece en una frecuencia significativamente más alta que la que se esperaría por distribución aleatoria de una posición particular en un péptido. Los residuos de anclaje son

15 residuos conservados que proveen un punto de contacto con la molécula MHC. Epítopes de células T identificados por dichos métodos predictivos pueden ser confirmados midiendo su unión a una proteína MHC específica y por su capacidad para estimular células T cuando se presentan en el contexto de la proteína MHC.

20 Favorablemente, los antígenos PreF (incluyendo PreF-G como se describe más adelante) incluyen un péptido de señal correspondiente al sistema de expresión, por ejemplo, un péptido de señal de mamífero o viral, tal como una secuencia de señal nativa F0 de RSV (v.gr., aminoácidos 1-25

de SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO:6). Típicamente, el péptido de señal se selecciona para ser compatible con las células seleccionadas para expresión recombinante. Por ejemplo, un péptido de señal (tal como un péptido de señal de baculovirus, o el péptido de señal de melittin, puede ser sustituido para expresión, en células de insecto. Péptidos de señal vegetales adecuados son conocidos en la técnica, si un sistema de expresión de planta es preferido. Numerosos péptidos de señal ilustrativos son conocidos en la técnica (véase, v.gr., *Zhang & Henzel, Protein Sci.*, 13:2819-2824 (2004), que describe numerosos péptidos de señal humanos) y son catalogados, v.gr., en la base de datos de péptidos de señal SPdb, que incluye secuencias de señal de archaea, procariotas y eucariotas (<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>). Opcionalmente, cualquiera de los antígenos anteriores puede incluir una secuencia adicional o etiqueta, tal como una etiqueta His para facilitar la purificación.

Opcionalmente, el antígeno PreF puede incluir componentes inmunogénicos adicionales. En ciertas modalidades particularmente favorables, el antígeno PreF incluye un componente antigénico de proteína G de RSV. Proteínas quiméricas ilustrativas que tienen un componente PreF y G incluyen las siguientes PreF_V1 (representada por SEQ ID NOS: 7 y 8) y PreF_V2 (representada por SEQ ID NOS: 9 y 10).

En los antígenos PreF-G, una porción antigénica de la proteína G (v.gr., una proteína G truncada, tal como residuos de aminoácido 149-229) se añade al extremo C de la construcción. Típicamente, el componente de

proteína G está unido al componente de la proteína F mediante una secuencia de enlazador flexible. Por ejemplo, en el diseño PreF_V1 ilustrativo, la proteína G está unida al componente PreF mediante un enlazador -GGSGGSGGS- (SEQ ID NO:14). En el diseño PreF_V2, el enlazador es más corto. En lugar de tener el enlazador -GGSGGSGGS- (SEQ ID NO:14), PreF_V2 tiene 2 glicinas (-GG-) para enlazador.

Cuando está presente, el dominio de polipéptido de proteína G puede incluir toda o parte de una proteína G seleccionada de cualquier cepa RSV A o RSV B. En ciertas modalidades ilustrativas, la proteína G es (o es 95% idéntica a) la proteína G representada por SEQ ID NO:4. Ejemplos adicionales de secuencias de proteína G adecuadas se pueden encontrar en el documento WO2008114149 (que se incorpora aquí por referencia).

El componente de polipéptido de proteína G se selecciona para incluir por lo menos una subsecuencia (ó fragmento) de la proteína G que retiene el epítipo(s) de células T inmunodominante, v.gr., en la región de aminoácidos 183-197, tal como fragmentos de la proteína G que incluyen los aminoácidos 151-229, 149-229 ó 128-229 de la proteína G nativa. En una modalidad ilustrativa, el polipéptido de proteína G es una subsecuencia (o fragmento) de un polipéptido de proteína G nativa que incluye todos o parte de los residuos de aminoácidos 149 a 229 de un polipéptido de proteína G nativa. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que porciones más largas o más cortas de la proteína G también se pueden usar, siempre que la porción seleccionada no desestabilice conformacionalmente o altere la expresión,

doblez o procesamiento del antígeno PreF-G. Opcionalmente, el dominio de proteína G incluye una sustitución de aminoácidos en la posición 191, que ha sido mostrada anteriormente que está implicada en la reducción y/o prevención de enfermedad incrementada caracterizada por eosinofilia asociada con vacunas de RSV inactivadas con formalina. Una descripción completa de los atributos de proteínas G que ocurren naturalmente y sustituidos (N191A) se puede encontrar, v.gr, en la publicación de patente de E.U.A. No. 2005/0042230, que se incorpora aquí por referencia.

Por ejemplo, con respecto a la selección de secuencias correspondientes a cepas que ocurren naturalmente, uno o más de los dominios puede corresponder en secuencia a una cepa RSV A o RSV B, tal como los aislados de laboratorio comunes designados A2 o Long, o cualquier otra cepa o aislado que ocurre naturalmente (como se describe en el documento WO2008114149 antes mencionado). Además de dichas variantes que ocurren naturalmente y aisladas, variantes genéticamente manipuladas que comparten similitud de secuencia con las secuencias antes mencionadas también se pueden utilizar en el contexto de antígenos PreF (incluyendo PreF-G). Los expertos en la técnica entenderán que la similitud entre polipéptido de antígeno PreF (y secuencias de polinucleótido como se describe más adelante), para polipéptido (y secuencias de nucleótido en general) se pueden expresar en términos de la similitud entre las secuencias, de otra manera referidas como identidad de secuencia. La identidad de secuencia frecuentemente se mide en términos de porcentaje de identidad (o de

similitud); mientras más alto es el porcentaje, más similares son las estructuras primarias de las dos secuencias. En general, mientras más similares son las estructuras primarias de dos secuencias de aminoácidos (o polinucleótido), más similares son las estructuras de orden superior que resultan del doblado y ensamble. Las variantes de secuencias de polipéptido PreF (y polinucleótido) típicamente tienen uno o un número pequeño de deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos pero sin embargo compartirán un porcentaje muy alto de su secuencia de aminoácidos, y generalmente de su secuencia de polinucleótidos. De manera más importante, las variantes retienen los atributos estructurales y por lo tanto conformacionales de las secuencias de referencia descritas aquí.

Los métodos de determinación de identidad de secuencia son bien conocidos en la técnica y son aplicables a polipéptidos de antígeno PreF, así como los ácidos nucleicos que los codifican (v.gr, como se describe más adelante). Varios programas y algoritmos de alineación 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 *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988. Altschul *et al.*, *Nature Genet.* 6:119, 1994, presenta una consideración detallada de métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología. La Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica de NCBI (BLAST) (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el

Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD) y en la Internet, para usarse en conexión con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en el sitio web de NCBI en la Internet.

En algunos casos, los antígenos PreF tienen una o más modificaciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la cepa que ocurre naturalmente de la cual se deriva (v.gr., además de las modificaciones de estabilización antes mencionadas). Dichas diferencias pueden ser una adición, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos. Una variante típicamente difiere en no más de aproximadamente 1%, o 2%, o 5%, o 10%, o 15%, o 20% de los residuos de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido de antígeno PreF de variante (incluyendo PreF-G) puede incluir 1 ó 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 polipéptido de antígeno PreF ilustrativas de SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 18, 20 y/o 22. Por lo tanto, una variante en el contexto de una proteína F o G de RSV, o antígeno PreF (incluyendo antígeno PreF-G), típicamente comparte por lo menos 80%, u 85%, muy comúnmente por lo menos aproximadamente 90% o más, tal como 95% o incluso 98% o 99% de identidad de secuencia con una proteína de referencia, v.gr., las secuencias de referencia ilustradas en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 18, 20 y/o 22, o

cualquiera de los antígenos PreF ilustrativos descritos aquí. Variantes adicionales incluidas como una característica de esta descripción son antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G) que incluyen toda o una parte de una secuencia de nucleótidos o aminoácidos seleccionada de las variantes que ocurren naturalmente descritas en el documento WO2008114149. Variantes adicionales pueden producirse a través de deriva génica, o pueden producirse artificialmente usando mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o por recombinación de dos o más variantes pre-existentes. Dichas variantes adicionales también son adecuadas en el contexto de antígenos PreF (y PreF-G) descritos aquí. Por ejemplo, la modificación puede ser una sustitución de uno o más aminoácidos, (tal como dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, cinco aminoácidos, hasta aproximadamente diez aminoácidos o más) que no altera la conformación o epítopes inmunogénicos del antígeno PreF resultante.

Alternativamente o adicionalmente, la modificación puede incluir una delección de uno o más aminoácidos y/o una adición de uno o más aminoácidos. De hecho, si se desea, uno o más de los dominios de polipéptido puede ser un polipéptido sintético que no corresponda a ninguna cepa individual, pero que incluya subsecuencias de componente de múltiples cepas, o incluso de una secuencia de consenso deducida por la alineación de múltiples cepas de polipéptidos de virus RSV. En ciertas modalidades, uno o más de los dominios de polipéptido son modificados por la adición de una secuencia de aminoácidos que constituye una etiqueta, que facilita el

procesamiento o purificación subsecuente. Dicha etiqueta puede ser una etiqueta antigénica o de epítopo, una etiqueta enzimática o una etiqueta de polihistidina. Típicamente, la etiqueta está situada en uno o el otro extremo de la proteína, tal como el C-terminal o N-terminal del antígeno o proteína de fusión.

Ácidos nucleicos que codifican antígenos PreF

Otro aspecto de la descripción se refiere a ácidos nucleicos recombinantes que codifican antígenos PreF como se describió anteriormente.

10 De manera más explícita, dichos ácidos nucleicos codifican polipéptidos que incluyen un antígeno de polipéptido de proteína F soluble que incluye un dominio F2 y un dominio F1 de un polipéptido de proteína F de RSV, que incluye por lo menos una modificación seleccionada de: (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización

15 heterólogo; (ii) una deleción de por lo menos un sitio de digestión de furina; (iii) una deleción de por lo menos un sitio de no digestión de furina; (iv) una deleción de uno o más aminoácidos del dominio pep27; y, (v) por lo menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrofílico en un dominio hidrofóbico del dominio extracelular de proteína F. Opcionalmente, dicho

20 polinucleótido codifica un antígeno PreF con una modificación en un sitio de glicosilación. La naturaleza y detalles estructurales de dichos polipéptidos se describieron con detalle anteriormente. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente secuencias de nucleótido que codifican cualesquiera y

todas las secuencias de polipéptido descritas con base en las enseñanzas de la presente, incluyendo las secuencias ilustrativas provistas en el listado de secuencias, y de otra manera incluidas (v.gr., por incorporación por referencia) en esta descripción.

5 En ciertas modalidades, los ácidos nucleicos recombinantes son optimizados en cuanto a codón para expresión en células hospederas procarióticas y eucarióticas seleccionadas. Por ejemplo, SEQ ID NOS: 5, 12, 17, 19 y 21 son diferentes ejemplos ilustrativos, no limitantes, de secuencias que codifican antígeno PreF, que han sido optimizados en cuanto a codón
10 para expresión en mamíferos, v.gr., células CHO. Para facilitar la replicación y expresión, los ácidos nucleicos pueden ser incorporados en un vector, tal como un vector de expresión procariótico o eucariótico. Las células hospederas que incluyen ácidos nucleicos que codifican antígeno PreF recombinantes también son una característica de la descripción. Las células
15 hospederas favorables incluyen células hospederas procarióticas (es decir, bacterianas) tales como *E. coli*, así como numerosas células hospederas eucarióticas, incluyendo células de hongos (v.gr., levaduras), células de insecto y células de mamífero (tales como células CHO, VERO y HEK293).

 Para facilitar la replicación y expresión, los ácidos nucleicos se
20 pueden incorporar en un vector, tal como un vector de expresión procariótico o uno eucariótico. Aunque los ácidos nucleicos descritos aquí se pueden incluir en cualquiera de una variedad 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 viruela aviar, pseudorrabia, adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y muchos otros, muy comúnmente el vector será un vector de expresión adecuado para generar

5 productos de expresión de polipéptido. En un vector de expresión, el ácido nucleico que codifica el antígeno PreF está dispuesto típicamente en proximidad y orientación a una secuencia de control de transcripción apropiada (promotor y opcionalmente, uno o más incrementadores) para dirigir

10 síntesis de ARNm. Es decir, la secuencia de polinucleótido de interés está operablemente enlazada a una secuencia de control de transcripción apropiada. Ejemplos de dichos promotores incluyen: el promotor temprano inmediato de CMV, LTR o promotor SV40, promotor de polihedrina de baculovirus, promotor lac o trp de *E. coli*, promotor de fago T7 y lambda P_L, y

15 otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión típicamente también contiene un sitio de unión a ribosoma para el inicio de traducción, y un terminador de transcripción. El vector opcionalmente incluye secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión

20 opcionalmente comprenden uno o más genes marcadores seleccionables para proveer un rasgo fenotípico para selección de células hospederas transformadas, tales como resistencia a la dihidrofolato reductasa o a la neomicina para cultivo de células eucarióticas, o tales como resistencia a la kanamicina, tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector de expresión también incluye elementos de expresión adicionales, por ejemplo, para mejorar la eficiencia de traducción. Estas señales pueden incluir, v.gr., un codón de inicio de ATG y secuencias adyacentes. En algunos casos, por ejemplo, un codón de inicio de traducción y elementos de secuencia asociados son insertados en el vector de expresión apropiado simultáneamente con la secuencia de polinucleótido de interés (v.gr., un codón de inicio nativo). En tales casos, no se requieren señales de control de traducción adicionales. Sin embargo, en casos en donde sólo una secuencia codificante de polipéptido o una porción de la misma, es insertada, señales de control de traducción exógenas, incluyendo un codón de inicio de ATG se provee para traducción del ácido nucleico que codifica antígeno PreF. El codón de inicio es colocado en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la secuencia de polinucleótido de interés. Elementos de transcripción exógenos y codones de inicio pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. Si se desea, la eficiencia de expresión puede ser además incrementada por la inclusión de incrementadores apropiados al sistema de célula en uso (Scharf *et al.*, (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bitter *et al.* (1987) Methods in Enzymol 153:516-544).

En algunos casos, el ácido nucleico (tal como un vector) que codifica el antígeno PreF incluye uno o más elementos de secuencia adicionales seleccionados para incrementar y/u optimizar la expresión de ácido nucleico que codifica PreF cuando es introducido en una célula hospedera. Por ejemplo, en ciertas modalidades, los ácidos nucleicos que

codifican el antígeno PreF incluyen una secuencia de intrón, tal como una secuencia de intrón de virus de herpes 5 humano (véase, v.gr., SEQ ID NO:13). Se ha demostrado repetidamente que los intrones incrementan la expresión de ácidos nucleicos homólogos y heterólogos cuando se colocan
5 apropiadamente en una construcción recombinante. Otra clase de secuencias incrementadoras de expresión incluye un elemento epigenético tal como una Región de Unión a Matriz (o MAR), o elemento epigenético similar, v.gr., elementos STAR (por ejemplo, tales como aquellos elementos STAR descritos en Otte *et al.*, *Biotechnol Prog.* 23:801-807, 2007). Sin estar ligado por la
10 teoría, se cree que MARs median el anclaje de la secuencia de ADN dirigida a la matriz nuclear, generando dominios de lazo de cromatina que se extienden hacia afuera desde núcleos de heterocromatina. Aunque MARs no contienen ninguna secuencia de consenso o reconocible obvia, su característica más consistente parece ser un contenido de A/T alto global, y las bases C
15 predominando en una cadena. Estas regiones parecen formar estructuras secundarias dobladas que pueden estar sujetas a separación de cadena, y pueden incluir un elemento de desenrollamiento de núcleo (CUE) que puede servir como el punto de nucleación para la separación de cadenas. Varios motivos de secuencia ricos en AT simples han sido asociados con secuencias
20 de MAR: v.gr., la caja A, la caja T, motivos de desenrollamiento de ADN, sitios de unión a SATB1 (H-box, A/T/C25) y sitios de topoisomerasa II de consenso para vertebrados o drosófila. Secuencias de MAR ilustrativas se describen en la solicitud de patente de E.U.A. publicada No. 20070178469, y en la solicitud

de patente internacional No. WO02/074969 (que se incorporan aquí por referencia). Secuencias de MAR adicionales que se pueden usar para incrementar la expresión de un ácido nucleico que codifica un antígeno PreF incluyen MAR de lisozima de pollo, MARp1-42, MARp1-6, MARp1-68 y
5 MARpx-29, descrita en Girod *et al.*, *Nature Methods*, 4:747-753, 2007 (descrita en Nos de Acceso a GenBank EA423306, DI107030, DI106196, DI107561 y DI106512, respectivamente). Un experto en la técnica apreciará que la expresión además puede ser modulada al seleccionar MAR que produce un nivel intermediario de incremento, como se reporta para MAR 1-9.
10 Si se desea, las secuencias de MAR alternativas para incrementar la expresión de antígeno PreF pueden ser identificadas buscando bases de datos de secuencia, por ejemplo, usando software tal como MAR-Finder (disponible en la web en futuresoft.org/MarFinder), SMARTest (disponible en la web en genomatix.de), o SMARScan 1 (Levitsky *et al.*, *Bioinformatics*
15 15:582-592, 1999). En ciertas modalidades, la MAR es introducida (v.gr., transfectada) en la célula hospedera en el mismo ácido nucleico (v.gr., vector) que la secuencia codificante de antígeno PreF. En una modalidad alternativa, la MAR es introducida en un ácido nucleico separado (v.gr., en trans) y opcionalmente puede co-integrarse con la secuencia de polinucleótido que
20 codifica antígeno PreF.

Procedimientos ilustrativos suficientes para guiar a un experto en la técnica a través de la producción de ácidos nucleicos de antígeno PreF recombinante se pueden encontrar en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, 2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a. ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos para 2003); y Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4a. ed., Wiley & Sons, 1999.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican polipéptidos de antígeno PreF son representados por SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y 21. Variantes que incluyen una modificación en un sitio de glicosilación, v.gr., en el aminoácido correspondiente a la posición 500 de SEQ ID NO:2 se pueden producir alterando (v.gr., mutando) los nucleótidos en la vecindad de las posiciones 1408-1414 (en comparación, por ejemplo, con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:12, v.gr., SEQ ID NOs:17 y 21). Las secuencias de nucleótidos adecuadas para codificar variantes de glicosilación (v.gr., que incrementa la eficiencia de glicosilación) incluyen: aacgggt, aacaagt, aacggga, y aacaaga. También son posibles secuencias alternativas, tales como cagcagt, que elimina un sitio de glicosilación. Variantes adicionales pueden ser producidas al ensamblar secuencias de polipéptido de proteína F y G análogas seleccionadas de cualquiera de las cepas de RSV descubiertas (o subsecuentemente) conocidas, v.gr., como se describe en el documento WO2008114149. Variantes de secuencia adicionales que comparten identidad de secuencia con las variantes ilustrativas pueden ser producidas por los expertos en la técnica. Típicamente, las variantes de ácido nucleico

codificarán polipéptidos que difieren en no more de 1%, o 2%, o 5%, o 10%, o 15%, o 20% de los residuos de aminoácido. Es decir, los polipéptidos codificados comparten por lo menos 80%, o 85%, muy comúnmente, por lo menos aproximadamente 90% o más, tal como 95%, o incluso 98% o 99% de

5 identidad de secuencia. Los expertos en la técnica entenderán inmediatamente que las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos PreF, como tales pueden compartir menos identidad de secuencia debido a la redundancia del código genético. En algunos casos, los antígenos PreF tienen una o más modificaciones de aminoácidos en relación

10 con la secuencia de aminoácidos de la cepa que ocurre naturalmente de la cual se derivan (v.gr., además de las modificaciones de estabilización antes mencionadas). Dichas diferencias pueden ser una adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Una variante típicamente difiere en no más de aproximadamente 1%, o 2%, o 5%,

15 o 10%, o 15%, o 20% de los residuos de nucleótido. Por ejemplo, una variante de ácido nucleico de antígeno PreF (incluyendo PreF-G) puede incluir 1 ó 2, o hasta 5, o hasta aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 15, o hasta aproximadamente 50, o hasta aproximadamente 100 diferencias de nucleótido en comparación con los ácidos nucleicos de antígeno PreF ilustrativos de

20 SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y/o 21. Por lo tanto, una variante en el contexto de una proteína F o G de RSV, o ácido nucleico de antígeno PreF (incluyendo antígeno PreF-G), típicamente comparte por lo menos 80%, o 85%, muy comúnmente, por lo menos aproximadamente 90% o más, tal como

95%, o incluso 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, v.gr., la secuencia de referencias ilustrada en SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 ó 21, o cualquiera de los otros ácido nucleico de antígeno PreF ilustrativos descritos aquí. Las variantes adicionales incluidas como una

5 característica de esta descripción son antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G) que incluyen toda o parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada de las variantes, que ocurren naturalmente descritas en el documento WO2008114149. Variantes adicionales pueden producirse a través de deriva génica, o se pueden producir artificialmente usando

10 mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o por recombinación de dos o más variantes preexistentes. Dichas variantes adicionales también son adecuadas en el contexto de los antígenos PreF (y PreF-G) descritos aquí.

Además de los ácidos nucleicos de la variante previamente descritos, los ácidos nucleicos que hibridan a uno o más de los ácidos

15 nucleicos ilustrativos representados por SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y 21 también se pueden usar para codificar antígenos PreF. Un experto en la técnica apreciará que, además de la medición de % de identidad de secuencia descrita antes, otros indicios de similitud de secuencia entre dos ácidos nucleicos es la capacidad para hibridar. Mientras más similares sean

20 las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más astringentes serán las condiciones a las cuales hibridarán. La astringencia de las condiciones de hibridación es dependiente de secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Por lo tanto, las condiciones de hibridación que dan

por resultado grados particulares de astringencia variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de hibridación. Generalmente, la temperatura de hibridación y la concentración iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del regulador de pH de hibridación determinará la astringencia de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la astringencia. Generalmente, las condiciones astringentes se seleccionan para ser aproximadamente 5°C a 2°C menores que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una concentración iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (bajo concentración iónica y pH definidos) a la cual 50% de la secuencia objetivo hibrida a una sonda perfectamente acoplada. Las condiciones para hibridación de ácido nucleico y cálculo de astringencias se puede encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993. y Ausubel et al *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Para los propósitos de la presente descripción, "condiciones astringentes" abarcan condiciones bajo las cuales la hibridación sólo ocurrirá si hay menos de 25% de discordancia entre la molécula de hibridación y la secuencia objetivo. Las "condiciones astringentes" se pueden descomponer

en niveles particulares de astringencia para una definición más precisa. Por lo tanto, como se usa aquí, condiciones de "astringencia moderada" son aquellas bajo las cuales las moléculas con más de 25% de discordancia de secuencia no hibridarán; condiciones de "astringencia media" son aquellas
5 bajo las cuales las moléculas con más de 15% de discordancia de secuencia no hibridarán, y condiciones de "astringencia alta" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más de 10% de discordancia no hibridarán. Condiciones de "astringencia muy alta" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más de 6% de discordancia no hibridarán. Por el contrario, los ácidos
10 nucleicos que hibridan bajo "condiciones de astringencia baja" incluyen aquellos con mucho menos identidad de secuencia, o con identidad de secuencia sólo sobre subsecuencias cortas del ácido nucleico. Por lo tanto, se entenderá que las diversas variantes de ácidos nucleicos que son abarcadas por la descripción son capaces de hibridar a por lo menos uno de SEQ ID
15 NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y/o 21 sustancialmente sobre su longitud entera.

Métodos de producción de polipéptidos antigénicos de RSV

Los antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G, y también en
20 donde es aplicable, antígenos G) descritos aquí son producidos usando procedimientos bien establecidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Los procedimientos suficientes para guiar a un experto en la técnica se pueden encontrar en las siguientes referencias: Sambrook et al,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; y Ausubel et al. *Short Protocols en Molecular Biology*, 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999. Detalles adicionales y específicos se proveen más adelante.

5 Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican los antígenos PreF son introducidos en células hospederas por cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos, tales como electroporación, transfección mediada por liposoma (v.gr., usando un reactivo de transfección liposomal comercialmente disponible, tal como LIPOFECTAMINE™2000 o

10 TRANSFECTIN™), precipitación con fosfato de calcio, infección, transfección y similares, dependiendo de la selección de vectores y células hospederas. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G) se proveen en SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y/o 21. Un experto en la técnica apreciará que SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y/o

15 21 son ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos que codifican las mismas proteínas que SEQ ID NOs: 5, 7 y 9, (v.gr., representadas por SEQ ID NOs: 6, 8 y 10), pero que difieren sólo por la redundancia del código genético (tal como por optimización de codones alternativa, como se muestra en SEQ ID NO: 12), se pueden usar

20 fácilmente en lugar de las secuencias de SEQ ID NOs: 5, 7 y 9 ilustrativas. Lo mismo es cierto de SEQ ID NOs: 17, 19 y 21. De manera similar, las secuencias de polinucleótidos que incluyen elementos incrementadores de expresión, tal como intrones internamente ubicados (o mediante la adición de

promotor, incrementador, intrón u otros elementos similares), como se ilustra en SEQ ID NO: 13, se pueden utilizar. Un experto en la técnica reconocerá que también son adecuadas las combinaciones de dichas modificaciones. De manera similar, secuencias homólogas seleccionadas de cualquier cepa RSV A o RSV B, y/u otras secuencias que comparten identidad de secuencia sustancial, como se describió antes, también se pueden usar para expresar antígenos PreF. De hecho, cualquiera de los ácidos nucleicos de variante previamente descritos pueden ser introducidos adecuadamente en células hospederas y usados para producir antígenos PreF (incluyendo antígenos PreF-G) y en donde es aplicable polipéptidos G.

Por ejemplo, en ciertos casos los ácidos nucleicos variantes son modificados para alterar el patrón de glicosilación, v.gr., como se describió antes por sustitución de uno o más aminoácidos en la vecindad de la posición 500 de aminoácido (con respecto a SEQ ID NO:2, v.gr., SEQ ID NO:17). Se ha encontrado que la modificación del patrón de glicosilación, v.gr., en combinación con la modificación de un sitio de reconocimiento de digestión, incrementa la producción del antígeno PreF en cultivo de células. En tales casos, los métodos descritos más adelante para expresar y aislar el antígeno recombinante PreFs proveen un procedimiento para incrementar la producción de un antígeno PreF al alterar el patrón de glicosilación de un antígeno PreF sustituyendo uno o más aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación, opcionalmente en combinación con la modificación de uno o más sitios de digestión (tales como un sitio de reconocimiento de digestión de

no furina o de furina) como se describió antes.

Las células hospederas que incluyen ácidos nucleicos que codifican antígeno PreF recombinante son, por lo tanto, también una característica de esta descripción. Las células hospederas favorables incluyen

5 células hospederas procarióticas (es decir, bacterianas), tales como *E. coli*, así como numerosas células hospederas eucarióticas, incluyendo células de hongos (v.gr., 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 pref.

10 recombinantes son introducidos (v.gr., transducidos, transformados o transfectados) en células hospederas, por ejemplo, mediante un vector, tal como un vector de expresión. Como se describió antes, el vector es muy típicamente un plásmido, pero dichos vectores también pueden ser, por ejemplo, una partícula viral, un fago, etc. Ejemplos de hospederos de

15 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

20 vegetales, incluyendo células de algas, etc. En algunos casos, se pueden usar células transitoriamente transfectadas para producir antígenos PreF recombinantes. En ciertas modalidades, las células (v.gr., clones) que han integrado establemente el ácido nucleico de PreF se seleccionan y se usan

para producir el antígeno PreF recombinante.

Las células hospederas pueden ser cultivadas en un medio de nutrientes convencional, modificado según es apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar las secuencias de polinucleótidos insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son típicamente aquellas previamente usadas con la célula hospedera seleccionada para expresión, y será evidente para los expertos en la técnica y en las referencias citadas aquí, incluyendo, v.gr., Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, New York y las referencias citadas aquí. Opcionalmente, las células hospederas se cultivan en medio libre de suero y/o libre de producto animal.

Los productos de expresión correspondientes a los ácidos nucleicos de la invención también pueden ser producidos en células que no son de animales tales como vegetales, levadura, hongos, bacterias y similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, detalles relacionados con cultivo de células se pueden encontrar en Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión

se pueden seleccionar dependiendo del uso pretendido para el producto expresado. Por ejemplo, cuando grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo son necesarios para la producción de anticuerpos, vectores que dirigen la expresión de nivel alto de proteínas de fusión que son fácilmente purificadas se utilizan favorablemente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, clonación de *E. coli* multifuncional y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los cuales la secuencia codificante de interés, v.gr., un polinucleótido de la invención como se describió antes, se puede ligar al vector en marco con secuencias para la metionina iniciadora de traducción amino-terminal y los 7 residuos subsecuentes de beta-galactosidasa que produce una proteína de fusión de beta galactosidasa catalíticamente activa; vectores pIN (Van Heeke & Schuster (1989) J Biol Chem 264:5503-5509). En ciertos ejemplos, los ácidos nucleicos son introducidos en células por medio de vectores adecuados para introducción y expresión en células procarióticas, v.gr., células de *E. coli*. Por ejemplo, un ácido nucleico que incluye una secuencia de polinucleótido que codifica un antígeno PreF puede ser introducida en cualquiera de una variedad de vectores comercialmente disponibles o de propiedad, tales como la serie de vectores de expresión pET (v.gr., pET9b y pET2d). La expresión de la secuencia codificante es inducible por IPTG, dando por resultado altos niveles de expresión de proteína. La secuencia de polinucleótido que codifica el antígeno PreF se transcribe bajo el promotor de fago T7. También son adecuados vectores alternativos, tales como pURV22 que incluyen un

promotor pL lambda inducible por calor.

El vector de expresión es después introducido (v.gr., por electroporación) en un hospedero bacteriano adecuado. Numerosas cepas adecuadas de *E. coli* están disponibles y pueden ser seleccionadas por un experto en la técnica (por ejemplo, las cepas Rosetta y BL21 (DE3) han probado ser favorables para la expresión de vectores recombinantes que contienen secuencias de polinucleótido que codifican antígenos PreF.

De manera similar, en levaduras, tales 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 la producción de los productos de expresión deseados. Para revisiones, véase Berger, Ausubel y, v.gr., Grant et al. (1987; Methods in Enzymology 153:516-544). En células hospederas de mamífero, se puede utilizar un número de sistemas de expresión, incluyendo tanto plásmidos como sistemas basados en virus.

En otro ejemplo, la secuencia de polinucleótido que codifica el antígeno PreF es introducida en células de insectos usando un sistema de vector de expresión de Baculovirus (BEVS). El baculovirus recombinante capaz de infectar células de insecto puede ser generado usando vectores, kits y/o sistemas comercialmente disponibles, tales como el sistema BD BaculoGold de BD BioScience. En pocas palabras, la secuencia de polinucleótido que codifica el antígeno es insertada en el vector de transferencia de pAcSG2. Después, las células hospederas SF9 (*Spodoptera*

frugiperda) son co-transfectadas por plásmido quimérico-pAcSG2 y BD BaculoGold, que contenía el ADN genómico linealizado del baculovirus *virus de polihedrosis nuclear de Autographa californica* (AcNPV). Después de la transfección, la recombinación homóloga ocurre entre el plásmido pACSG2 y el genoma de Baculovirus para generar el virus recombinante. En un ejemplo, el antígeno PreF es expresado bajo el control regulador del promotor de polihedrin (pH). Vectores de transferencia similares pueden ser producidos usando los promotores, tales como los promotores básico (Ba) y p10. De manera similar, se pueden utilizar células de insecto alternativas, tales como SF21 que está estrechamente relacionada con el Sf9, y la línea celular High Five derivada de una oruga medidora de la col, *Trichoplusia ni*.

De manera más general, los polinucleótidos que codifican el antígeno PreFs son incorporados en los vectores de expresión que son adecuados para la introducción y expresión en células eucarióticas (v.gr., células de insecto o mamífero). Favorablemente, dichos ácidos nucleicos son optimizados en cuanto a codón para la expresión en el vector/célula hospedera seleccionados (por ejemplo, las secuencias ilustradas en SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 y 21 son optimizadas en codón para la expresión en células CHO). En una modalidad ilustrativa, la secuencia de polinucleótido que codifica el antígeno PreF es introducida en un vector, tal como el vector pEE14 desarrollado por Lonza Biologicals. El polipéptido es expresado bajo un promotor constitutivo, tal como el promotor de CMV temprano (CytoMegalovirus) inmediato. La selección de las células establemente

transfectadas que expresan el polipéptido se hace con base en la capacidad de las células transfectadas para crecer en ausencia de una fuente de glutamina. Las células que han integrado exitosamente el pEE14 son capaces de crecer en ausencia de glutamina exógena, debido a que el vector pEE14
5 expresa la enzima GS (Glutamina Sintetasa). Las células seleccionadas pueden ser clonalmente expandidas y caracterizadas para expresión del polipéptido PreF deseado.

Una célula hospedera se escoge opcionalmente por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para
10 procesar la proteína expresada en la forma deseada. Dichas modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, (así como, v.gr., acetilación, carboxilación, fosforilación, lipidación y acilación). El procesamiento post-traducciona, por ejemplo, que digiere una forma de precursor en una forma madura de la proteína (por ejemplo, por una furina
15 proteasa) se realiza opcionalmente en el contexto de la célula hospedera. Diferentes células hospederas tales como 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38, etc., tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades de post-traducción y se pueden escoger para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la
20 proteína extraña introducida.

Para producción de alto rendimiento, a largo plazo, de antígenos PreF recombinantes descritos aquí, típicamente se usan sistemas de expresión estables. Por ejemplo, las líneas de células que expresan

establemente un polipéptido de antígeno PreF son introducidas en la célula hospedera usando vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se deja que las células
5 crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que sean cambiadas a medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Por ejemplo, grupos o colonias resistentes de células
10 establemente transformadas se pueden hacer proliferar usando cultivo de tejido técnicas apropiadas al tipo de célula. Las células hospederas transformadas con un ácido nucleico que codifica un antígeno PreF se cultivan opcionalmente bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo de células. Como se indicó antes, si se
15 desea, las células hospederas se pueden cultivar en un medio libre de suero (y/o libre de producto animal).

Después de la transducción de una línea de células hospederas adecuada y el crecimiento de las células hospederas a una densidad de células apropiada, el promotor seleccionado es inducido por medios
20 apropiados (v.gr., cambio de temperatura o inducción química) y las células son cultivadas durante un período adicional. Opcionalmente, el medio incluye componentes y/o aditivos que reducen la degradación de proteínas expresadas por proteinasas. Por ejemplo, el medio usado para cultivar células

para producir antígeno PreF puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como un agente quelatador o inhibidor de molécula pequeña (v.gr., AZ11557272, AS111793, etc.), para reducir o eliminar digestión no deseada por proteinasas celulares, o extracelulares (v.gr., matriz).

5 El producto de polipéptido secretado es entonces recuperado del medio de cultivo. Alternativamente, las células pueden ser cosechadas por centrifugación, alteradas por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante retenido para purificación posterior. Células eucarióticas y microbianas utilizadas en expresión de proteínas pueden ser alteradas por
10 cualquier método conveniente, incluyendo ciclo de congelamiento-descongelamiento, sonicación, alteración mecánica, o uso de agentes de lisis celular, u otros métodos, que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los antígenos PreF expresados se pueden recuperar y purificar
15 de cultivos de células recombinantes por cualquiera de un número de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción con ácido, filtración, ultrafiltración, centrifugación, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de
20 afinidad (v.gr., usando cualquiera de los sistemas de etiquetas indicados en la presente), cromatografía de hidroxipatita, y cromatografía de lectina. Pasos de redoble de proteína se pueden usar, según se desee, al completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, la cromatografía de líquidos

de alto rendimiento (CLAR) se puede utilizar en los pasos de purificación finales. Además de las referencias indicadas anteriormente, una variedad de métodos de purificación son bien conocidos en la técnica, incluyendo, v.gr., aquellos expuestos Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; and Bollag et al (1996) Protein Methods. 2ª Edición Wiley-Liss, NY; Walker (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 Resolución Methods and Applications. segunda edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ.

En una modalidad ilustrativa, las proteínas PreF son recuperadas de células de conformidad con el siguiente esquema de purificación. Después de la introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido PreF en las células CHO hospederas, las células transitoriamente transfectadas o poblaciones estables expandidas que comprenden la secuencia de polinucleótido introducida se hacen crecer en un medio y bajo condiciones adecuadas para crecer a una escala aceptable para el propósito deseado (v.gr., como se describe generalmente en Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, New York y las referencias citadas en el mismo). Por lo general, las células se hacen crecer en un medio libre de suero a 37°C y pasan a

intervalos de 2-3 días en matraces de agitación o en biorreactores. Nuevos cultivos establecidos a partir de las células expandidas en estas condiciones, se llevan a cabo típicamente en biorreactores en un medio libre de suero y se incuban a 27°C con pO₂ mantenido a 20% durante 5 a 7 días para producir el
5 antígeno preF.

Para recuperar antígeno PreF recombinante, el cultivo de células es centrifugado y el sobrenadante del cultivo de células almacenado a menos 70°C hasta antes de usarse. Después de descongelar los sobrenadantes de cultivo, los sobrenadantes se diluyen 2 x con agua MilliQ y se ajustan a pH 6.0
10 con HCl. El sobrenadante diluido se carga a 75 cm/hr en una resina 3 L CM Ceramic HyperD FF empacada en columna BPG 140/500, equilibrada en 20 mM de fosfato pH 6.0. Después de cargar la muestra, el regulador de pH de equilibrio es procesado a través de la columna para regresar a la línea basal de UV. Después de lavar con 5 volúmenes de columna (CV) de 25 mM de
15 regulador de pH de fosfato pH 7.0, se realiza elución usando un regulador de pH de 50 mM de fosfato pH 7.0 que contiene 0.1 M de NaCl.

El producto eluido CM Hyper D se diluye 3.3 x con 20 mM de fosfato, pH 7.0 para ser procesado en una columna Tipo II de 270 ml de hidroxiapatita (empacada en XK 50), equilibrado con 20 mM de regulador de
20 pH de PO₄ (Na) pH 7.0, a 50 mL/min. Después de lavar la columna con el regulador de pH de equilibrio (~3 CV), se realiza elución usando un regulador de pH de 20 mM de PO₄ (Na) pH 7.0 que contiene 0.5 M NaCl.

El producto eluido HA es procesado a 15 mL/min (con respecto a

un tiempo de contacto de 10 minutos con la resina), en una columna Capto Adhere de 150 mL (empacada en XK 26), equilibrada en 20 mM de fosfato pH 7.0. Después de lavarse con 5 CV de 10 mM de fosfato pH 7.0 que contiene 0.1 M de regulador de pH de arginina, se realiza elución usando un regulador de pH de 10 mM de fosfato pH 7.0 que contiene 0.6 M de arginina.

El producto eluido Capto Adhere es después concentrado aproximadamente 10 x para procesar en una columna de cromatografía de exclusión de tamaño preparativa (SEC). La concentración se realiza usando una membrana de polietersulfona 50 kD Pellicon. Antes de ser procesado en la columna SEC, el material es filtrado a través de un filtro PLANOVA 20N 100 cm², usado como un paso de aclaramiento viral. Este paso de nanofiltración puede ser colocado después o antes de la concentración en la membrana Pellicon.

Después se realiza SEC preparativa usando una columna 500 mL Superdex S200 y 10 mM de fosfato (Na/K₂), 160 mM de NaCl, regulador de pH a pH 6.5 (correspondiente al regulador de pH final) como fase móvil. Un volumen de PreF concentrado correspondiente a 5% de volumen de columna SEC se carga en la resina a ~2.6 mL/min. Por lo general, se colectan fracciones de 10 mL. Acervos analíticos de fracciones se pueden analizar en gel de SDS por tinción con plata y Western blot anti HCP (proteínas de células hospederas) si se desea para optimizar rendimientos mientras se reducen al mínimo los niveles de HCP.

El volumen purificado se obtiene después de filtrarse en filtros

Millex de 0.22 μm (alternativamente se puede usar un filtro Sterivex). Si se desea, la preparación de antígeno PreF purificado se puede almacenar a menos 70°C antes de usarse.

Alternativamente, proteínas PreF pueden incluir una etiqueta de polihistidina (v.gr., seis histidina), que se puede utilizar para facilitar la purificación. Para dichos polipéptidos PreF etiquetados con histidina, se puede utilizar el siguiente protocolo de purificación. Antes de la purificación usando cromatografía de afinidad de ion de metal inmovilizado (IMAC), el sobrenadante del cultivo de células se diluye dos veces en regulador de pH A (20 mm Bicine, pH 8.5) y el pH se ajusta a 8.5. La solución resultante se carga en una columna de Q sefarosa FF (GE Healthcare), v.gr., de 23 ml de volumen de columna, previamente equilibrada con regulador de pH A. Proteínas PreF se capturan en la columna, junto con algunos contaminantes de células hospederas. Los componentes del medio de cultivo que interferirían con el paso de purificación de IMAC no son retenidos y son eliminados en el flujo pasante. Las proteínas son separadas y eluidas por una elución paso a paso de 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM y 1M de NaCl. Las proteínas PreF de interés son eluidas durante el primer paso a 200 mM de NaCl. Opcionalmente, la recuperación se puede monitorear usando SDS PAGE y western blotting usando un anticuerpo anti His-tag para detectar la proteína PreF etiquetada. Las fracciones pueden ponerse en acervo antes de continuar la purificación.

El producto eluido que contiene la proteína PreF (en acervo) es

diluido tres veces en regulador de pH B (20 mM de Bicine, 500 mM de NaCl, pH 8,3) y el pH se ajusta a 8.3. La solución resultante se carga en resina IMAC sefarosa FF cargada con cloruro de níquel (GE Healthcare) (v.gr., de 5 ml de volumen de columna), previamente equilibrado con regulador de pH B. PreF se une a la resina y la mayoría de los contaminantes de las células hospederas se eluyen en el flujo pasante. La columna se lava con 20 mM de imidazol a fin de remover contaminantes débilmente unidos. Proteínas PreF son eluidas mediante una elución por pasos de 250 mM de imidazol. SDS PAGE teñida con azul de coomassie y anti His-tag de Western blot se pueden realizar para identificar fracciones positivas.

El acervo de IMAC entonces se puede concentrar a una concentración de por lo menos 150 µg/ml usando un dispositivo de concentración centricon (Millipore) y la proteína puede ser dializada en regulador de pH PBS complementado con 500 mM de L-Arginina. La proteína resultante se cuantifica usando la prueba de proteína RCDC (BioRad) y se almacena a -70 o -80°C hasta usarse.

Composiciones y métodos inmunogénicos

También se proveen composiciones inmunogénicas que incluyen cualquiera de los antígenos PreF descritos anteriormente (tales como aquellos ilustrados por SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 18, 20 y 22) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En ciertas modalidades, típicamente, las modalidades en las

cuales el antígeno PreF no incluye un componente de proteína G (tal como SEQ ID NO:6), la composición inmunogénica puede incluir una proteína G aislada, recombinante y/o purificada. Numerosas proteínas G adecuadas se han descrito en la técnica, e incluyen proteínas G recombinantes de longitud completa y proteínas quiméricas hechas de una porción de la proteína G (tal como aminoácidos 128-229 ó 130-230) y una pareja de fusión (tal como tiorredoxina), o una secuencia de señal y/o escalera, que facilita la expresión y/o purificación. Las proteínas G ilustrativas para usarse en mezcla con un antígeno PreF se pueden encontrar en el documento WO2008114149, patente de E.U.A. No. 5,149,650, patente de E.U.A. No. 6,113,911, solicitud publicada de E.U.A. No. 20080300382, y patente de E.U.A. No. 7,368,537, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia. Como se indica con respecto a las proteínas PreF-G quiméricas, un fragmento más pequeño de la proteína G, tal como la porción entre los aminoácidos 149-229, o la porción entre aproximadamente 128 a aproximadamente 229 se puede utilizar favorablemente en el contexto de mezclas que implican a PreF (sin G) y G. Como se describió antes, la consideración importante es la presencia de epitopes inmunodominantes, v.gr., incluidos dentro de la región de aminoácidos 183-197. Alternativamente, una proteína G de longitud completa se puede utilizar en dichas composiciones.

Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el vehículo o excipiente pueden incluir favorablemente un regulador

de pH. Opcionalmente, el vehículo o excipiente también contiene por lo menos un componente que estabilice la solubilidad y/o estabilidad. Ejemplos de agentes de solubilización/estabilización incluyen detergentes, por ejemplo, laurel sarcosina y/o tween. Los agentes de solubilización/estabilización
 5 alternativos incluyen arginina, y polioles formadores de vidrio (tales como sacarosa, trehalosa y similares). Numerosos vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica y se describen, v.gr., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5ª edición (975).

10 Por consiguiente, los excipientes y vehículos adecuados pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica para producir una formulación adecuada para suministrar a un sujeto mediante una vía de administración seleccionada.

Los excipientes adecuados incluyen, sin limitación: glicerol,
 15 polietilenglicol (PEG), sorbitol, trehalosa, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, L-prolina, sulfobetaina no detergente, clorhidrato de guanidina, urea, óxido de trimetilamina, KCl, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y otras sales relacionadas con catión divalente, ditiotreitól, ditioeritrol, y β -mercaptoetanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (incluyendo: Tween80, Tween20, Triton X-00, NP-40,
 20 Empigen BB, octilglucósido, lauroil maltósido, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, desoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio).

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también

incluyen un adyuvante. En el contexto de una composición inmunogénica adecuada para administración a un sujeto para el propósito de producir una respuesta inmunológica protectora contra RSV, el adyuvante se selecciona para producir a respuesta inmunológica balanceada derivada de TH1 o

5 Th1/Th2, caracterizado por la producción de interferón-gamma (IFN- γ).

El adyuvante es típicamente seleccionado para incrementar una respuesta inmunológica derivada de Th1 (o una respuesta inmunológica equilibrada por Th1/Th2), caracterizada por la producción y secreción de IFN- γ , en el sujeto, o población de sujetos, a quienes se administra la

10 composición. Por ejemplo, cuando la composición inmunogénica ha de ser administrada a un sujeto de un grupo de edad particular susceptible a (o en riesgo incrementado de) infección por RSV, el adyuvante se selecciona para ser seguro y efectivo en el sujeto o población de sujetos. Por lo tanto, cuando se formula una composición inmunogénica que contiene un antígeno PreF de

15 RSV para administración en un sujeto de edad avanzada (tal como a sujeto mayor de 65 años de edad), el adyuvante se selecciona para ser seguro y efectivo en sujetos de edad avanzada. De manera similar, cuando la composición inmunogénica que contiene el antígeno PreF de RSV está diseñado para administración en sujetos neonatales o niños pequeños (tales

20 como sujetos entre el nacimiento y la edad de dos años), el adyuvante se selecciona para ser seguro y efectivo en neonatos y niños pequeños. En el caso de un adyuvante seleccionado para seguridad y eficacia en neonatos y niños pequeños, se puede seleccionar una dosis de adyuvante que es una

dilución (v.gr., una dosis fraccionada) de una dosis típicamente administrada a un sujeto adulto.

Además, el adyuvante es típicamente seleccionado para incrementar una respuesta inmunológica de Th1 cuando se administra por una vía de administración, por la cual la composición inmunogénica es administrada. Por ejemplo, cuando se formula una composición inmunogénica que contiene un antígeno PreF para administración nasal, proteosoma y protolin son adyuvantes de derivación de Th1 favorables. Por el contrario, cuando la composición inmunogénica se formula para administración intramuscular, los adyuvantes que incluyen uno o más de 3 D-MPL, escualeno (v.gr., QS21), liposomas, y/o aceite y emulsiones acuosas son favorablemente seleccionadas.

Un adyuvante adecuado para usarse en combinación con antígenos PreF es un derivado de lipopolisacárido bacteriano no tóxico. Un ejemplo de un derivado no tóxico adecuado de lípido A, es lípido monofosforílico A o muy particularmente lípido monofosforílico A 3-desacilado (3D-MPL). 3D-MPL es vendido bajo el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A., y es referido a lo largo del documento como MPL o 3D-MPL. Véase, por ejemplo, patentes de E.U.A. Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094. 3D-MPL promueve principalmente respuestas de células CD4+T con un fenotipo IFN- γ (Th1). 3 D-MPL puede ser producido de conformidad con los métodos descritos en GB2220211 A. Químicamente es una mezcla de lípido monofosforílico A 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En las

composiciones de la presente invención, se puede usar 3D-MPL de partícula pequeña. 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que puede ser filtrado en forma estéril a través de un filtro de 0.22 μm . Dichas preparaciones se describen en el documento WO94/21292.

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

 En otras modalidades, el lipopolisacárido puede ser un disacárido de $\beta(1-6)$ glucosamina, como se describe en la patente de E.U.A. No. 6,005,099 y Patente EP No. 0 729 473 B1. Un experto en la técnica podría
20 producir fácilmente varios lipopolisacáridos, tales como 3D-MPL, con base en las enseñanzas de estas referencias. Sin embargo, cada una de estas referencias es incorporada aquí por referencia. Además de los inmunoestimulantes antes mencionados (que son similares en estructura a los

de LPS o MPL o 3D-MPL), derivados de monosacárido y disacárido acilados que son una sub-porción para la estructura anterior de MPL también son adyuvantes adecuados. En otras modalidades, el adyuvante es un derivado sintético de lípido A, algunos de los cuales se describen como agonistas de

- 5 TLR-4, e incluyen, pero no se limitan a: OM 174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-
 [(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-o-fosfono- β -D-glucopiranosil]-2-
 [(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- α -D-glucopiranosildifosfato ácido), (WO
 95/14026); OM 294 DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-
 oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-
 10 bis(fosfato diácido) (WO 99/64301 y WO 00/0462); y OM 197 MP-Ac DP (3S-,
 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-
 hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol,1-fosfato diácido 10-(6-
 aminohexanoato) (WO 01/46127).

- Otros ligandos TLR4 que se pueden usar son fosfatos de
 15 alquilglucosaminida (AGPs) tales como aquellos descritos en el documento
 WO 98/50399 o patente de E.U.A. No. 6,303,347 (también se describen
 procedimientos para la preparación de AGPs), adecuadamente RC527 o
 RC529 o sales farmacéuticamente aceptables de AGPs como se describe en
 la patente de E.U.A. No. 6,764,840. Algunos AGPs son agonistas de TLR4, y
 20 algunos son antagonistas de TLR4. Se enseña que ambos son útiles como
 adyuvantes.

Otros ligandos TLR4 adecuados, capaces de causar una
 respuesta de señalización a través de TLR-4 (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5)

son, por ejemplo, lipopolisacárido de bacterias gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros antagonistas de TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; Proteína A de agente tensoactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparán, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensin-2, y dipéptido d muramilo (MDP). En una modalidad, el agonista de TLR es HSP 60, 70 ó 90. Otros ligandos TLR4 adecuados son como se describe en el documento WO 2003/011223 y en el documento WO 2003/099195, tales como compuesto I, compuesto II y compuesto III descritos en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195 y en particular aquellos compuestos descritos en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764. Por ejemplo, un ligando TLR-4 adecuado es ER804057.

Agonistas de TLR adicionales también son útiles como adyuvantes. El término "agonista de TLR" se refiere a un agente que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una vía de señalización de TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de la generación de ligando endógeno o exógeno. Dichos agonistas de TLR naturales o sintéticos se pueden usar como adyuvantes alternativos o adicionales. Una breve revisión del papel de TLRs como receptores de adyuvante se provee 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 modalidad, el adyuvante y composición inmunogénica además comprende un adyuvante que se selecciona del grupo que consiste de: un agonista de TLR-
 5 1, un agonista de TLR-2, un agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, un agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, un agonista de TLR-9, o una combinación de los mismos.

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

En una modalidad alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2 es uno o más de una lipoproteína, un
 20 peptidoglican, un lipopéptido bacteriano de *M tuberculosis*, *B burgdorferi* o *T pallidum*; peptidoglicanos de especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, *Neisseria porins*, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de *Yersina*, CMV viriones, haemaglutinina

de sarampión, y zimosán de levadura.

En una modalidad alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-3. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de
5 señalización a través de TLR-3 es ARN de doble cadena (ARNdc), o ácido poliinosínico-policitidílico (Poly IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado con infección viral.

En una modalidad alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5.
10 Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5 es flagelina bacteriana.

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

En una modalidad alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7.
20 Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7 es un ARN de cadena sencilla (ARNcs), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o derivado del mismo. En una modalidad, el

agonista de TLR es imiquimod. Además, agonistas de TLR7 se describen en el documento WO 2002/085905.

En una modalidad alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-8.

5 Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-8 es un ARN de cadena sencilla (ARNcs), una molécula de imidazoquinolina con actividad antiviral, por ejemplo resiquimod (R848); resiquimod también es capaz de reconocimiento por TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que se pueden usar incluyen aquellos descritos en el

10 documento WO 2004/071459.

En una modalidad alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9. En una modalidad, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es HSP90. Alternativamente, el agonista de

15 TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es ADN bacteriano o viral, ADN que contiene nucleótidos de CpG no metilados, en particular contextos de secuencia conocidos como motivos de CpG. Oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta de Th1 predominantemente. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se

20 describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y patentes de E.U.A. Nos. 6,008,200 y 5,856,462. Adecuadamente, los nucleótidos de CpG son oligonucleótidos de CpG. Los oligonucleótidos adecuados para usarse en las composiciones inmunogénicas de la presente

100

invención son oligonucleótidos que contienen CpG, opcionalmente que contienen dos o más motivos de CpG de dinucleótido separados por lo menos por tres, adecuadamente por lo menos seis o más nucleótidos. Un motivo de CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina. Los
5 oligonucleótidos de CpG de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una modalidad específica, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o adecuadamente un enlace de fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros internucleótidos están dentro del alcance de la invención. También incluidos dentro del alcance de la invención
10 son los oligonucleótidos son enlaces de internucleótido mixtos. Los métodos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en las patentes de E.U.A. Nos. 5,666,153, 5,278,302 y el documento WO 95/26204.

Otros adyuvantes que se pueden usar en composiciones
15 inmunogénicas con un antígeno PreF, v.gr., como tales o en combinación con 3D-MPL, u otro adyuvante descrito aquí, son saponinas, tales como QS21.

Las 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 esteroides o glicósidos
20 de triterpeno ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animales marinos. Las saponinas se señalan para formar soluciones coloidales en agua que forman espuma al agitarse, y para precipitar colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares crean estructuras en forma de poros

en la membrana que causan que la membrana se reviente. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas, pero no todas las, saponinas.

Las saponinas son conocidas como adyuvantes en vacunas para administración sistémica. El adyuvante y actividad hemolítica de saponinas individuales han sido estudiados extensivamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, antes citados). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina), y fracciones del mismo, se describen en US 5,057,540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y EP 0 362 279 B1. Estructuras particulares, denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas por CLAR) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes, y el método de su producción se describe en la patente de E.U.A. No.5,057,540 y EP 0 362 279 B1, que se incorporan aquí por referencia. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen aquellos derivados de otras especies vegetales tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford et al, Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

QS21 es una fracción no tóxica purificada por CLAR derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina. Un método para producir QS21 se describe en la patente de E.U.A. No. 5,057,540. Formulaciones adyuvantes no

reactogénicas que contienen QS21 se describen en WO 96/33739. Las referencias antes mencionadas se incorporan aquí por referencia. Dicha saponina inmunológicamente activa, tal como QS21, se puede usar en cantidades de entre 1 y 50 µg, por dosis humana de la composición

5 inmunogénica. Ventajosamente, 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 modalidad, 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

10 6-14 µg, por ejemplo entre 7-13 µg o entre 8-12 µg o entre 9-11 µg, o 10 µg. En una modalidad adicional, 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 dichas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son

15 adyuvantes estimulantes de Th1 exitosos cuando se formulan junto con un antígeno. Por lo tanto, por ejemplo, los polipéptidos PreF se pueden utilizar favorablemente en composiciones inmunogénicas con un adyuvante que comprende una combinación de QS21 y colesterol.

Opcionalmente, el adyuvante también puede incluir sales

20 minerales tales como sales de aluminio o calcio, en particular hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio. Por ejemplo, un adyuvante que contiene 3 D-MPL en combinación con una sal de aluminio (v.gr., hidróxido de aluminio o "alumbre") es adecuado para formulación en una

composición inmunogénica que contiene un antígeno PreF para administración a un sujeto humano.

Otra clase de adyuvantes de derivación de Th1 adecuados para usarse en formulaciones con antígenos PreF incluye composiciones

5 inmuoestimulantes basadas en OMP. Las composiciones inmuoestimulantes basadas en OMP son particularmente adecuadas como adyuvantes de mucosa, v.gr., para administración intranasal. Las composiciones inmuoestimulantes basadas en OMP son un género de preparaciones de proteínas de membrana externa (OMPs, incluyendo algunas

10 porinas) de bacterias gram-negativas, tales como, pero sin limitarse a, especies de *Neisseria* (véase, v.gr., Lowell et al, J. Exp. Med. 167:658, 1988; Lowell et al, Science 240:800, 1988; Lynch et al, Biophys. J. 45:104, 1984; Lowell, en "New Generación Vaccines" 2a ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, página 193, 1997; patente de E.U.A. No. 5,726,292; patente

15 de E.U.A. No. 4,707,543), que son útiles como un vehículo o en composiciones para inmunógenos, tales como antígenos bacterianos o virales. Algunas composiciones inmuoestimulantes basadas en OMP se pueden referir como "proteosomas", que son hidrofóbicos y seguros para uso humano. Los proteosomas tienen la capacidad de auto-ensamblarse en

20 vesículas o agregados de OMP similares a vesícula de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 800 nm, y para incorporar de manera no covalente, coordinar, asociar (v.gr., electrostáticamente o hidrofóbicamente), o de otra manera cooperar con antígenos de proteína (Ags), particularmente antígenos

que tienen una porción hidrofóbica. Cualquier método de preparación que da por resultado el componente de proteína de membrana externa en forma de vesícula o similar a vesícula, incluyendo estructuras membranosas multi-moleculares o composiciones de OMP en forma globular fundida de uno o
5 más OMPs, se incluye dentro de la definición de proteosoma. Los proteosomas se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en la técnica (véase, v.gr., patente de E.U.A. No. 5,726,292 o patente de E.U.A. No. 5,985,284). Los proteosomas también pueden contener un lipopolisacárido endógeno o lipooligosacárido (LPS o LOS, respectivamente) que se origina de
10 la bacteria usada para producir las porinas de OMP (v.gr., especies de *Neisseria*), que generalmente será menor que 2% de la preparación de OMP total.

Los proteosomas están compuestos principalmente de proteínas de membrana externa químicamente extraídas (OMPs) de *Neisseria*
15 *meningitidis* (en su mayoría porinas A y B así como OMP de clase 4), mantenidas en solución por detergente (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generación Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Los proteosomas se pueden formular con una variedad de
20 antígenos tales como proteínas purificadas o recombinantes derivadas de fuentes virales, incluyendo los polipéptidos PreF descritos aquí, v.gr., por procedimientos de diafiltración o diálisis tradicionales. La remoción gradual de detergente permite la formación de complejos hidrofóbicos en 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 Generación Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

- 5 "Proteosoma: LPS o Protolina", como se usa aquí, se refiere a preparaciones de proteosomas mezclados, v.gr., mediante la adición exógena, con por lo menos un tipo de lipopolisacárido para proveer una composición de OMP-LPS (que puede funcionar como una composición inmunoestimulante). Por lo tanto, la composición de OMP-LPS puede estar compuesta de dos de
- 10 los componentes básicos de protolina, que incluyen (1) una preparación de proteína de membrana externa de proteosomas (v.gr., proyuvante) 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 (v.gr., contenido naturalmente con la preparación de proteosoma de
- 15 OMP), se puede mezclar o combinar con una preparación de OMP a partir de un lipo-oligosacárido exógenamente preparado (v.gr., preparado de un cultivo o microorganismo diferente que la preparación de OMP), o puede ser una combinación de los mismos. Dicho LPS exógenamente añadido puede ser de la misma bacteria Gram-negativa de la cual se hizo la preparación de OMP o
- 20 de una bacteria Gram-negativa diferente.⁹ También se debe entender que la protolina incluye opcionalmente lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, moléculas pequeñas, o similares, y combinaciones de las mismas. La protolina se puede preparar, por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud de

patente de E.U.A. No. 2003/0044425.

Las combinaciones de diferentes adyuvantes, tales como aquellos mencionados de aquí en adelante, también se pueden usar en composiciones con antígenos PreF. Por ejemplo, como ya se señaló, QS21 se
5 puede formular con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL típicamente será del orden de 1:10 a 10:1; tal como 1:5 a 5:1, y a menudo sustancialmente 1:1. Típicamente, la relación 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,
10 esta combinación puede incrementar una respuesta inmunológica 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 de calcio, fosfato de aluminio o hidróxido de
15 aluminio. En donde está presente el alumbre, v.gr., en combinación con 3D-MPL, la cantidad es típicamente entre aproximadamente 100 µg y 1 mg, tal como de aproximadamente 100 µg, o aproximadamente 200 µg a aproximadamente 750 µg, tal como aproximadamente 500 µg por dosis.

En algunas modalidades, el adyuvante incluye una emulsión de
20 aceite y agua, v.gr., una emulsión de aceite en agua. Un ejemplo de una emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, un tocol tal como a tocoferol, v.gr., alfa-tocoferol, v.gr., alfa-tocoferol, y un agente tensoactivo, tal como trioleato de sorbitán (Span 85™) o

monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80™), en un vehículo acuoso. En ciertas modalidades, la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante(s) adicional, (en particular, no contiene un derivado de lípido A no tóxico, tal como 3D-MPL, o una saponina, tal como QS21). El

5 vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina regulada en su pH con fosfato. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

En otra modalidad de la invención, se provee una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición de antígeno y una

10 composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua y opcionalmente uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde 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 emulsionante.

15 En una modalidad específica, la formulación de adyuvante incluye 3D-MPL preparado en forma de una emulsión, tal como una emulsión de aceite en agua. En algunos casos, la emulsión tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0.2 µm de diámetro, como se describe en el documento WO 94/21292. Por ejemplo, las partículas de 3D-MPL pueden ser

20 suficientemente pequeñas para ser filtradas en forma estéril a través de una membrana de 0.22 micras (como se describe en la patente europea número 0 689 454). Alternativamente, el 3D-MPL se puede preparar en una formulación liposomal. Opcionalmente, el adyuvante que contiene 3 D-MPL (o un derivado

del mismo) también incluye un componente inmunoestimulante adicional.

El adyuvante se selecciona para ser seguro y efectivo en la población a la cual se administra la composición inmunogénica. Para poblaciones de adultos y personas de edad avanzada, las formulaciones típicamente incluyen más de un componente de adyuvante que el que se encuentra típicamente en una formulación para niños pequeños. En las formulaciones particulares que usan una emulsión de aceite en agua, dicha emulsión puede incluir componentes adicionales tales como, por ejemplo, colesterol, escualeno, alfa tocoferol, y/o un detergente, tal como tween 80 o span85. En formulaciones ilustrativas, dichos componentes pueden estar presentes en las siguientes cantidades: de aproximadamente 1- 50 mg de colesterol, de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de alfa tocoferol y de 0.3 a 3% de tween 80. Típicamente, la relación de escualeno:alfa tocoferol es igual a o menor que 1 ya que esto provee una emulsión más estable. En algunos casos, la formulación también puede contener un estabilizador.

Cuando una composición inmunogénica con un antígeno de polipéptido PreF se formula para administrarse a un niño pequeño, la dosis de adyuvante se determina que es efectiva y relativamente no reactogénica en un niño pequeño. Generalmente, la dosis de adyuvante en una formulación para niños pequeños es más baja (por ejemplo, la dosis puede ser una fracción de la dosis provista en una formulación que se ha de administrar a adultos) que aquella usada en formulaciones diseñadas para administrarse a adultos (v.gr., adultos de 65 años de edad o mayores). Por ejemplo, la cantidad de 3D-MPL

está típicamente en el intervalo de 1 μ g-200 μ g, tal como 10-100 μ g, o 10 μ g-50 μ g por dosis. Una dosis para niños pequeños está típicamente en un extremo de este intervalo, v.gr., de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 50 μ g, tal como de aproximadamente 2 μ g, o 5 aproximadamente 5 μ g, o aproximadamente 10 μ g, a aproximadamente 25 μ g, o a aproximadamente 50 μ g. Típicamente, en donde QS21 se usa en la formulación, los intervalos son comparables (y de conformidad con las relaciones indicadas anteriormente). En el caso de una emulsión de aceite y agua (v.gr., una emulsión de aceite en agua), la dosis de adyuvante provista a un niño o niño pequeño puede ser una fracción de la dosis administrada a un sujeto adulto. Una demostración de la eficacia de composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno PreF en combinación con varias dosis de un adyuvante de aceite en agua ilustrativo se provee en el ejemplo 9.

Una composición inmunogénica típicamente contiene una cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccionada de la misma) del antígeno y se puede preparar por técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, incluyendo aquellas para administración a sujetos humanos, generalmente se describe en Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller et al, University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se

describe, por ejemplo, en Fullerton, patente de E.U.A. 4,235,877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se describe, por ejemplo, en Likhite, patente de E.U.A. 4,372,945 y en Armor et al, patente de E.U.A. 4,474,757.

5 Típicamente, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos colaterales adversos, significativos en el sujeto típico. Inmunoprotector en este contexto no necesariamente significa completamente protector contra infección; significa protección contra síntomas
10 o enfermedad, especialmente enfermedad severa asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo de que inmunógeno específico se utilice. Generalmente, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1000 µg de proteína, tal como de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a
15 aproximadamente 50 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg, o aproximadamente 50 µg. La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona con base en la población del
20 sujeto (v.gr., niños pequeños o personas de edad avanzada). Una cantidad óptima para una composición particular se puede lograr por estudios estándares que implican la observación de títulos de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden

recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas.

Cabe señalar que independientemente del adyuvante seleccionado, la concentración en la formulación final se calcula para que sea segura y efectiva en la población objetivo. Por ejemplo, las composiciones
5 inmunogénicas para producir una respuesta inmunológica contra RSV en humanos se administran favorablemente a niños pequeños (v.gr., niños pequeños entre el nacimiento y 1 año, tal como entre 0 y 6 meses, a la edad de dosis inicial). Las composiciones inmunogénicas para producir una respuesta inmunológica contra RSV también se administran favorablemente a
10 humanos de edad avanzada (v.gr., solas o en una combinación con antígenos de otros patógenos asociados con COPD). Se apreciará que la elección de adyuvante puede ser diferente en estas aplicaciones diferentes, y el adyuvante y concentración óptimos para cada situación pueden ser determinados empíricamente por los expertos en la técnica.

15 En ciertas modalidades, las composiciones inmunogénicas son vacunas que reducen o previenen infección con RSV. En algunas modalidades, las composiciones inmunogénicas son vacunas que reducen o previenen una respuesta patológica después de infección con RSV. Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno
20 PreF se formulan con por lo menos un antígeno adicional de un organismo patógeno distinto de RSV. Por ejemplo, el organismo patógeno puede ser un patógeno del tracto respiratorio (tal como un virus o bacteria que causa una infección respiratoria). En ciertos casos, la composición inmunogénica

106

contiene un antígeno derivado de un virus patógeno distinto de RSV, tal como un virus que causa una infección del tracto respiratorio, tal como influenza o parainfluenza. En otras modalidades, los antígenos adicionales se seleccionan para facilitar la administración o reducir el número de inoculaciones requeridas para proteger a un sujeto contra una pluralidad de organismos infecciosos. Por ejemplo, el antígeno se puede derivar de cualquiera o más de influenza, hepatitis B, difteria, tétanos, pertussis, *Hemophilus influenzae*, virus de la polio, *Streptococcus* o *Pneumococcus*, entre otros.

Por consiguiente, el uso de antígenos PreF o ácidos nucleicos que los codifican en la preparación de un medicamento para tratar (ya sea terapéuticamente después de, o profilácticamente antes de) la exposición a o infección por RSV es también una característica de esta descripción. Asimismo, los métodos para producir una respuesta inmunológica contra RSV en un sujeto son una característica de esta descripción. Dichos métodos incluyen la administración de una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que comprende un antígeno PreF a un sujeto, tal como un sujeto humano. Comúnmente, la composición incluye un adyuvante que produce una respuesta inmunológica derivada de TH1. La composición se formula para producir una respuesta inmunológica específica para RSV sin incrementar enfermedad viral después de contacto con RSV. Es decir, la composición se formula para y da por resultado una respuesta inmunológica derivada de TH1 que reduce o previene infección con un RSV y/o reduce o previene una respuesta patológica después de infección con un RSV. Aunque la

composición puede ser administrada por una variedad de diferentes vías, muy comúnmente, las composiciones inmunogénicas son suministradas por una vía de administración intramuscular o intranasal.

Una composición inmunogénica típicamente contiene una
5 cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccionada de la misma) del antígeno y se puede preparar por técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, incluyendo aquellas para administración a sujetos humanos, generalmente se describe en Pharmaceutical
Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach,
10 editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller et al, University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, patente de E.U.A. 4,235,877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se describe, por ejemplo, en
15 Likhite, patente de E.U.A. 4,372,945 y en Armor et al, patente de E.U.A. 4,474,757.

Típicamente, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos colaterales adversos, significativos en
20 el sujeto típico. Inmunoprotector en este contexto no necesariamente significa completamente protector contra infección; significa protección contra síntomas o enfermedad, especialmente enfermedad severa asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo de qué inmunógeno

107

especifico se utilice. Generalmente, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1000 μg de proteína, tal como de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 100 μg , por ejemplo, de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 50 μg , tal como aproximadamente 1 μg , aproximadamente 2 μg , aproximadamente 5 μg , aproximadamente 10 μg , aproximadamente 15 μg , aproximadamente 20 μg , aproximadamente 25 μg , aproximadamente 30 μg , aproximadamente 40 μg , o aproximadamente 50 μg . La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona con base en la población del sujeto (v.gr., niños pequeños o personas de edad avanzada). Una cantidad
5
10 óptima para una composición particular se puede lograr por estudios estándares que implican la observación de títulos de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4-12 semanas. Por ejemplo, cuando se administra una composición inmunogénica que contiene un antígeno PreF
15 a un niño pequeño, la inoculación inicial y las subsecuentes se pueden administrar para coincidir con otras vacunas administradas durante este periodo.

Los siguientes ejemplos se proveen para ilustrar ciertas características y/o modalidades particulares. Estos ejemplos no deben
20 considerarse para limitar la invención a las características o modalidades particulares descritas.

EJEMPLO 1

Antígenos PreF ilustrativos

El antígeno PreF fue modificado en comparación con una
5 proteína F de RSV nativa a fin de estabilizar la proteína en su conformación
de prefusión, con base en la predicción de que una respuesta inmunológica
generada a la conformación de prefusión de F incluiría preferiblemente
anticuerpos que previniera la unión, cambio de conformación y/u otros eventos
implicados en fusión de membrana, incrementando así la eficacia de la
10 respuesta protectora.

Las figuras 1A y B ilustran esquemáticamente características de
F0 de RSV y antígenos recombinantes PreF ilustrativos. La figura 1A es una
representación de una proteína F0 de RSV. F0 es una pre-proteína que
consiste de 574 aminoácidos. La pre-proteína F0 es proteolíticamente
15 procesada y glicosilada después de la traducción. Un péptido de señal, que
posteriormente es removido por una peptidasa de señal, dirige la traducción
de la pre-proteína F0 al retículo endoplásmico (RE). El péptido naciente en RE
es entonces N-glicosilado en múltiples sitios (representados por triángulos). La
digestión por furina de F0 genera dominios de péptido F2 y F1, que son
20 doblados y ensamblados juntos como un trimero de heterodímeros F2-F1 (es
decir, 3 veces F2-F1). En su estado nativo, la proteína F es anclada a la
membrana por una hélice de transmembrana en la región C-terminal.
Características adicionales del polipéptido F0 incluyen 15 residuos de cisteína,

4 epítopes neutralizantes caracterizados, dos regiones de enrollamiento de hélice enrollada y un motivo de lipidación. La figura 1B ilustra características de antígenos PreF ilustrativos. Para construir el antígeno PreF, el polipéptido F0 fue modificado para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F, reteniendo así los epítopes inmunogénicos predominantes de la proteína F como se presentan por el virus RSV antes de unirse a y fusionarse con las células hospederas. Las siguientes mutaciones estabilizantes fueron introducidas en el antígeno PreF en relación con el polipéptido F0. Primero, un dominio de hélice enrollada estabilizador se colocó en el extremo C-terminal del dominio extracelular del polipéptido F0, reemplazando el dominio de anclaje de membrana de F0. Segundo, el péptido prep27 (situado entre los dominios F2 y F1 en la proteína nativa) fue removido. Tercero, ambos motivos de furina fueron eliminados. En modalidades alternativas, (PreF_V1 y PreF_V2 designados) una porción inmunológicamente activa (v.gr., aminoácidos 149-229) de la proteína G de RSV se añadió al dominio C-terminal.

En otras modalidades, se introdujeron modificaciones para alterar (incrementar o disminuir) la glicosilación y/o para reducir la digestión por una proteasa distinta de furina.

EJEMPLO 2**Producción y purificación de proteína recombinante PreF de células CHO**

Una secuencia de polinucleótidos recombinante que codificaba
5 un antígeno PreF ilustrativo se introdujo en las células CHO hospederas para
la producción de antígeno PreF. Las células hospederas transfectadas
transitoriamente o poblaciones estables expandidas que comprendían la
secuencia de polinucleótido introducida se hicieron crecer en un medio y bajo
condiciones adecuadas para crecimiento a una escala aceptable para el
10 propósito deseado (v.gr., como se describe generalmente en Freshney (1994)
Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-
Liss, Nueva York y las referencias citadas en la misma). Típicamente, las
células se hicieron crecer en un medio libre de suero en matraces con
agitación a 37°C con 5% de CO₂ y se hicieron pasar en intervalo de 2-3 días,
15 o en biorreactores a 29°C con pO₂ mantenido a 20%.

Para recuperar el antígeno PreF recombinante, el cultivo de
células se centrifugó y el sobrenadante de cultivo de células almacenado se
almacenó a 80°C hasta uso posterior. Para análisis adicional, alícuotas de 2
litros del sobrenadante de cultivo de células se diluyeron 2x con agua
20 purificada y se ajustaron a pH 9.5 con NaOH. El sobrenadante se cargó a una
velocidad de 14 ml/min sobre una columna de intercambio de iones Q
Sephacrose FF (60 ml, 11.3 cm), se equilibraron en piperazina 20 mM, pH 9.5.
Después de lavar la columna con regulador de pH de partida, se realizó

elución con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M de NaCl en 20 volúmenes de columna (tamaño de fracción 10 ml). Las fracciones se analizaron sobre gel de SDS PAGE mediante tinción de plata y western blot. Las fracciones que contenían proteína PreF sustancial después se pusieron en acervo antes de
5 procesamiento posterior.

La elución en acervo del paso Q (~130 mls) se sometió a intercambio de regulador de pH a fosfato 10 mM, pH 7.0 usando el sistema de TFF a escala de mesa de laboratorio de Millipore con el casete de membrana Pellicon XL PES Biomax 100 (MWCO 10,000 Da). El material resultante tuvo
10 un pH de 7.0 y una conductividad de 1.8 mS/cm. 100 ml de esta muestra se cargaron en 5 ml/min, en un gel de hidroxapatita II (HA TII) de 10 ml (XK 16, altura=5 cm) equilibrado con regulador de pH de PO_4 (Na) 10 mM, pH 7.0. Después de lavar la columna con el regulador de pH de partida, la elución se realizó con un gradiente de 10 mM a 200 mM de PO_4 (Na), pH 7.0 en 20
15 volúmenes de columna. Las fracciones nuevamente se analizaron sobre SDS PAGE con tinción de plata y azul de coomassie y las fracciones positivas se pusieron en acervo.

Después de cromatografía de afinidad, las fracciones en acervo se concentraron y el regulador de pH se intercambió a DPBS (pH ~7.4) usando una unidad de concentrador Vivaspin 20, 10,000 Da MWCO. El
20 producto final fue de aproximadamente 13 ml. La concentración de proteína fue de 195 $\mu\text{g/ml}$, evaluado por ensayo de Lowry. La pureza fue mayor que 95%. La preparación de antígeno PreF purificado se esterilizó mediante filtro y

se almacenó a -20°C antes de usarse.

EJEMPLO 3

Caracterización de proteína recombinante PreF producida en células

5

CHO

Proteína recombinante PreF producida en células CHO se caracterizó por fraccionamiento de flujo de campo asimétrico (AFF-MALS) y se comparó con un antígeno quimérico incluyendo componentes de proteína F y G de RSV. AFF-MALS permite la separación de especies de proteína de conformidad con su tamaño molecular en un flujo de líquido con interacción de matriz mínima y análisis adicional mediante dispersión de luz de ángulos múltiples para determinación de peso molecular exacto. La figura 2A muestra que más de 65% de material de FG purificado se encuentra como oligómeros de peso molecular alto (100-100,000 KDa) en un regulador de pH PBS final mientras que 3% permanece en forma monomérica.

La figura 2B muestra que la proteína PreF purificada es doblada en su forma trimérica a una proporción de 73% en regulador de pH de PBS. 10% del material se encuentra como oligómeros de 1,000 a 20,000 KDa. Estos resultados indican que la proteína PreF recombinante expresada en células CHO es doblada como un trímero como se predice para el estado nativo.

La proteína PreF purificada también fue entrelazada con

glutaraldehído para el doble propósito de confirmar la naturaleza soluble de la proteína en solución de regulador de pH de fosfato y de generar agregados para evaluación *in vivo* comparativa con proteína FG (véase ejemplo 7 adelante). El entrelazamiento de glutaraldehído es conocido para proveer 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)).

La proteína se incubó con 1%, 2% y 5% de agente entrelazador de glutaraldehído durante 4 horas a 4°C y la reacción se bloqueó mediante la adición de NaBH₄. El exceso de glutaraldehído fue removido por desalación en columna en regulador de pH PBS. La proteína resultante se cuantificó por absorbancia a 280 nm y se evaluó por SDS PAGE en condiciones de desnaturalización y reducción. La mayor parte de PreF recombinante purificado se determinó que migra como un trimero en solución de PBS. El incremento en la temperatura de incubación a 23°C se requirió para convertir la mayor parte de proteína trimérica a agregados de peso molecular alto, como se confirma por SDS PAGE.

EJEMPLO 4

Inhibición de neutralización *in vitro* por el antígeno PreF

Sueros humanos obtenidos de voluntarios se determinaron selectivamente para reactividad contra RSV A por ELISA y usados para el

ensayo de inhibición de neutralización (NI) a dilución relevante basada en titulación potencial de neutralización de RSV anterior para cada muestra de suero. En breve, los sueros se mezclaron con proteínas inhibidoras (PreF o una proteína de control correspondiente esencialmente a FG quimérico descrito en la patente de E.U.A. No. 5,194,595, designada RixFG) a concentraciones de 25 µg/ml en DMEM con 50% de medio 199-H, con 0.5% de FBS, 2 mM de glutamina, 50 µg/ml de genamicina (todas de Invitrogen), y se incubaron 1.5 a 2 horas a 37°C en una rueda giratoria. 20 µl de las diluciones seriales de suero y proteína se mezclaron con una placa de 96 pozos de fondo redondo con RSV A titulado para optimizar el intervalo de inhibición para cada muestra de suero. Las muestras resultantes se incubaron durante 20 minutos a 33°C bajo 5% de CO₂ para mantener el pH.

Las mezclas de suero-inhibidor-virus se colocaron después en placas de 96 pozos de fondo plano sembradas con células Vero previamente y se incubaron durante 2 horas a 33°C antes de la adición de 160 µl de medio. Las placas después se incubaron durante 5-6 días a 33°C con 5% de CO₂ hasta ensayo de inmunofluorescencia para detección de título de NI. Después de la fijación durante 1 hora con 1% de paraformaldehído en solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS), las placas fueron bloqueadas con 2% de leche/PBS y regulador de pH de bloque. El anticuerpo anti-RSV de cabra (Biodesign International; 1:400) se añadió a cada pozo sin enjuagar y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Las muestras se lavaron 2x con PBS y con IgG-FITC anti-cabra (Sigma; 1:400) en regulador de pH bloqueador

se añadió a los pozos. Las placas se incubaron nuevamente durante 2 horas a TA y se lavaron 2x con lo anterior antes de la lectura. Un pozo se consideró positivo cuando se detectó ≥ 1 de sincicio fluorescente. Los cálculos del 50% de dosis infectiva de tejido de cultivo (TCID₅₀) se realizaron usando el método de Spearman-Kärber (SK) y los porcentajes de NI calculados como sigue:

$$[(\text{título Neut de } 0 \text{ } \mu\text{g/ml de inhibidor} - \text{título de Neut de } 25 \text{ } \mu\text{g/ml de inhibidor}) / \text{título de Neut de } 0 \text{ } \mu\text{g/ml de inhibidor}] \times 100.$$

Resultados ilustrativos mostrados en la figura 3 indican que PreF es superior a FG en NI en 16/21 donadores probados.

10

EJEMPLO 5

El antígeno PreF es inmunogénico

Para demostrar la inmunogenicidad del antígeno PreF, ratones fueron inmunizados dos veces, a intervalos de dos semanas con PreF (6.5, 3.1, 0.63, 0.13 y 0.025 $\mu\text{g/ml}$) y un adyuvante Th1 que contenía 3D MPL y QS21 a 1/20 de dosis humana ("AS01E") o preF (1, 0.2 y 0.04 $\mu\text{g/ml}$) y un adyuvante Th1 que contenía 3D MPL y alumbre 1/10 de dosis humana ("AS04C") y suero se recolectaron tres días más tarde.

Los títulos de anticuerpo de IgG específicos de antígeno se determinaron en muestras de suero en acervo por ELISA de conformidad con procedimientos estándares. En breve, placas de 96 pozos fueron recubiertas con RSV A, RSV B y proteína preF homóloga inactivados, purificados, y se

incubaron durante la noche a 4°C. Las muestras de suero fueron diluidas en serie en regulador de pH de bloqueo empezando a una concentración inicial de 1:50, junto con IgG de ratón purificada Sigma, ON) a concentraciones de partida de 200 ng/ml e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo de unión se detectó con IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, ON). 3,3A,5,5A-tetrametilbencidina (TMB, BD Opt EIATM, BD Biosciences, ON) se usó como el substrato para HRP. 50 µl de H₂SO₄ 1M se añadió a cada pozo para detener la reacción. Los valores de absorbancia para cada pozo se detectaron a 450 nm con un lector de microplaca de Molecular Devices (Molecular Devices, E.U.A.).

Los resultados representativos detallados en las figuras 4A y 4B muestran que títulos fuertes son producidos contra RSV A y RSV B después de inmunización con antígeno preF.

15

EJEMPLO 6

PreF produce anticuerpos neutralizantes

La presencia y cantidad de anticuerpos neutralizantes se evaluó en muestras de suero de ratones inmunizados como se describió anteriormente en el ejemplo 5. Sueros de acervo de animales inmunizados fueron diluidos en serie a partir de una dilución de partida de 1:8 en un medio de RSV en placas de 96 pozos (20 µ/pozo). Los pozos de control contenían únicamente medio RSV, o anticuerpo anti-RSV de cabra a 1:50 (Biodesign

112

International). 500-1,000 dosis infecciosas de una cepa RSV A o B representativa se añadieron a los pozos, y las placas se incubaron durante 20 minutos a 33°C, 5% de CO₂, antes de que la mezcla fuera transferida a placas de fondo plano de 96 pozos, previamente sembradas con 1x10⁵ células/ml de células Vero. Las células se incubaron durante aproximadamente 2 horas a 33°C, 5% de CO₂ y se realimentaron, antes de la incubación durante 5-6 días a la misma temperatura. Los sobrenadantes se removieron; las placas se lavaron con PBS y se adhirieron células fijadas con 1% de paraformaldehído en PBS durante 1 hora, seguido por inmunofluorescencia indirecta (IFA) usando anticuerpo primario anti RSV de cabra y anti-IgG FITC de cabra para detección.

Los resultados representativos mostrados en las figuras 5A y 5B, respectivamente, demuestran que los anticuerpos neutralizantes significativos contra ambas cepas de RSV se detectaron en el suero de animales inmunizados con preF.

EJEMPLO 7

PreF protege contra desafío de RSV

Los ratones fueron inmunizados dos veces IM en un intervalo de dos semanas como se describió antes, y fueron desafiados tres semanas después de la segunda inyección con RSV A. La protección contra RSV se evaluó midiendo el virus presente en los pulmones después del desafío. En

breve, los pulmones de animales inmunizados fueron removidos asépticamente después de eutanasia y se lavaron en un medio de RSV usando 2 volúmenes de 10 ml/pulmón en tubos de 15 ml. Los pulmones después se pesaron y se homogeneizaron individualmente en un medio de RSV con homogeneizador Potter automatizado (Fisher, Nepean ON), y se centrifugaron a 2,655 x g durante 2 minutos a 4°C. El virus presente en los sobrenadantes se tituló por dilución en serie (ocho réplicas empezando a 1:10) en una monocapa de células Vero (ATCC# CCL-81) previamente sembradas en placas de 96 pozos e incubadas durante 6 días. RSV se detectó por IFA indirecto después de fijar en 1% de paraformaldehído/PBS, pH 7.2, con anticuerpo primario anti-RSV de cabra y anticuerpo secundario anti-IgG de cabra marcado con FITC.

Los resultados representativos mostrados en las figuras 6A y B demuestran que dosis iguales que o más altas que 0.4 µg cuando se dan en presencia de adyuvante producen protección fuerte contra RSV.

EJEMPLO 8

PreF no induce reclutamiento de eosinófilos pulmonares después del desafío

20

Para evaluar el potencial del antígeno PreF para provocar enfermedad exacerbada después de inmunización y desafío subsecuente, grupos de ratones (5 ratones/grupo) fueron inmunizados 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 fueron desafiados con RSV a 3 semanas después del refuerzo y lavado broncoalveolar (BAL) se realizó 4 días después del desafío. Los infiltrados de leucocitos totales en BAL fueron enumerados por ratón así como en numeraciones diferenciales ((300 células) con base en morfología celular de macrófagos/monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos.

Los números totales de células se multiplicaron por porcentajes diferenciales de eosinófilos para cada animal. Se representan medios geométricos por grupo con 95% de límites de confianza. Los resultados representativos mostrados en la figura 7 demuestran que los eosinófilos no son reclutados en los pulmones después de inmunización con preF y desafío. Además, estos resultados sugieren que la naturaleza soluble del antígeno preF, en comparación con una forma agregada deliberadamente de preF (tratamiento con glutaraldehído) o antígeno de FG (naturalmente agregado) no favorece a los eosinófilos.

EJEMPLO 9

Inmunogenicidad de antígeno PreF formulado con diluciones de un

adyuvante de emulsión de aceite en agua

Ratones recibieron 250 ng de preF formulado con el adyuvante de aceite en agua ilustrativo, AS03A, a una 1/10 de la dosis "completa"

humana (AS03A) de 10.70 mg de escualeno, 11.88 mg de DL- α -tocoferol, 4.85 mg de polisorbato 80, 1/2 de dosis (AS03B), 1/4 de dosis (AS03C), o sin adyuvante. Los ratones de control recibieron AS03A solo o PBS. Los ratones fueron inmunizados los días 0 y 14. La recolección de sangre, esplenocitos y el desafío se realizaron el día 39 (25 días después de la dosis 2). Los pulmones fueron homogeneizados para titulación de RSV 4 días después del desafío.

Los títulos de anticuerpo IgG específicos de antígeno se determinaron en muestras de suero individuales por ELISA. En breve, placas de 96 pozos fueron revestidas con RSV A inactivado purificado e incubadas durante la noche a 4°C. Las muestras de suero se diluyeron en serie en regulador de pH de bloqueo empezando a 1:200, junto con IgG de ratón purificada (Sigma, ON), a concentraciones iniciales de 200 ng/ml y se incubaron durante 2 hr a 37°C. El anticuerpo unido se detectó con IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, ON). 3,3A,5,5A-tetrametilbenzidina (TMB, BD Opt ELATM, BD Biosciences, ON) se usó como el sustrato para HRP. 50 μ l de H₂SO₄ 1M se añadió a cada pozo para detener la reacción. Los valores de absorbancia para cada pozo se detectaron a 450 nm con un lector de microplaca Molecular Devices (Molecular Devices, USA). Los resultados se ilustran en la figura 8. La concentración de IgG Anti-RSV de aproximadamente 250,000 ng/mL se observe en suero de ratones inmunizados con preF en combinación con AS03A, AS03B o AS03C, mientras se observó muy poco (1828 ng/ml) en

suero de ratones inmunizados con preF solo.

Sueros de acervo de animales inmunizados se diluyeron en serie de una dilución inicial de 1:8 en un medio con RSV en placas de 96 pozos (20 μ l/pozo). Los pozos de control contenían medio con RSV únicamente o anticuerpo anti-RSV de cabra a 1:50 (Biodesign international). Se añadió una cepa larga de RSV, las placas se incubaron durante 20 minutos a 33°C y la mezcla se transfirió a placas de fondo plano de 96 pozos previamente sembrados con 1×10^5 células/mL de células Vero. Después de 5-6 días a la misma temperatura, los sobrenadantes fueron removidos; las placas se lavaron con PBS y células adherentes se fijaron con 1% de paraformaldehído en PBS durante 1 hora, seguido por inmunofluorescencia indirecta (IFA). La figura 9 muestra que independientemente de la cantidad de AS03 administrada en combinación con preF, los títulos de anticuerpo neutralizante de RSV siguen siendo los mismos ($\sim 11 \log_2$), mientras que el título de anticuerpo neutralizante de RSV en los ratones inmunizados sin AS03 fueron significativamente más bajos ($\sim 6 \log_2$).

Los pulmones de animales inmunizados fueron asépticamente removidos después de eutanasia y se lavaron en un medio con RSV usando 2 volúmenes de 10 ml/pulmón en tubos de 15 ml. Después se pesaron y se homogeneizaron individualmente en un medio con RSV con un homogeneizador Potter automatizado (Fisher, Nepean ON), y se centrifugaron a $2655 \times g$ durante 2 minutos a 4°C. El virus presente en los sobrenadantes se tituló. En breve, homogenados de pulmón se diluyeron en serie en ocho

réplicas empezando a 1:10 en una monocapa de células Vero previamente sembradas (ATCC# CCL-81) en placas de 96 pozos y se incubaron 5-6 días. RSV se detectó por IFA indirecta. La figura 10 ilustra los resultados que demuestran que no se observó diferencia en protección entre ratones
5 inmunizados con preF en combinación con AS03A, AS03B o AS03C, mientras se observó menos protección en ratones inmunizados en ausencia de AS03.

Estos resultados demuestran que el antígeno PreF se puede formular a través de una amplia gama de concentraciones de adyuvante para producir una composición que produce una respuesta inmunológica contra
10 RSV.

FIG. 10

PROTECCIÓN

RSV

1

2

3

4

5

Listado de Secuencias

SEQ ID NO:1

Secuencia de Nucleótidos que codifica la proteína de Fusión de referencia RSV

5 Cepa A2 GenBank Acceso No. U50362
 atggagttgctaattcctcaaagcaaattgcaattaccacaatcctcactgcagtcacatttgttttgctt
 ctggtcaaaaacatcactgaagaattttatcaatcaacatgcagtcgagtagcaaaggctatcttagtgc
 tctgagaactgggttggtataccagtggtataactatagattaagtaatatcaaggaaaataagtgtaat
 10 ggaacagatgctaaggtaaaattgataaacaagaattagataaatataaaaatgctgtaacagaattgc
 agttgctcatgcaaagcaccagcaacaacaatcgagccagaagagaactaccaaggtttatgaatta
 tacactcaaaatgccaaaaaaaccaatgtaacattaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttt
 tgtaggtgttggtatctgcaatcgccagtggtgctgtatctaaggtcctgcacctgaaggggaagt
 gaacaagatcaaaagtgtcttactatccacaaacaaggctgtagtcagttatcaaattggagttagtgtc
 ttaaccagcaaaagtgttagacctcaaaaactatatagaaaacaattgttacctattgtgaacaagcaaa
 15 gctgcagcatatcaaatatagcaactgtatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagattac
 caggggaatttagtgttaagcaggtgttaactacacctgtaagcacttacatgttaactaatagtgaatta
 ttgtcattatcaatgatatgcctataaacaatgatcagaaaaagttaatgtccaacaatgttcaaatgt
 tagacagcaaaagttactctatcatgtccataataaaagaggaagtccttagcatatgtgtacaattacca
 ctatatgggtgttatagatacacacctgttggaactacacacatccccctatgtacaaccaacacaaaag
 20 aagggtccaacatctgtttaaacaagaactgacagaggtggtactgtgacaatgcaggatcagtatcttt
 ctccccacaagctgaaacatgtaaagtcaatcaaactcgagtattttgtgacacaatgaacagtttaaca
 ttaccaagtgaagtaaaactctgcaatgttgacatattcaaccccaaatatgattgtaaaattatgactt
 caaaaacgatgtaagcagctccgttatcacatctctaggagccattgtgtcatgctatggcaaaacaaa
 tgtacagcatccaataaaaaatcgtggaatcataaagacattttctaacgggtgcgatatgtatcaata
 25 aaggggtggacactgtgtctgttaggtaacacattatattatgtaaaaagcaagaaggtaaaagtctcta
 tgtaaaaggtgaaccaataataaattttctatgaccttagtattccccctctgatgaatttgatgcac
 atatctcaagtcaacgagaagattaacagagccttagcattttatcgtaaatccgatgaattattacata
 atgtaaatgctggtaatccaccataaatatcatgataactactataattatagtgattatagtaattatt
 gttatcttaattgtgtgttgactgtctcttataactgtaaggccagaagcacaccagtcacactaagaaag
 30 atcaactgagtggtataaataatattgcatttagtaactaa

SEQ ID NO:2

Secuencia de aminoácidos del precursor F0 de la proteína F de referencia RSV

35 Cepa A2 GenBank Acceso No. AAB86664
 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRRRFL
 GFLLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTskvldlknYIDKQLLPiv
 NKQSCSISNIATVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSN
 40 NVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDN
 AGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIV
 SCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF
 PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTINIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKA
 RSTPVTLSKDQLSGINNIASFN
 45

SEQ ID NO:3

Secuencia de Nucleótidos que codifica la proteína G de referencia RSV Longitud de Cepa

50 Atgtccaaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaagacctgggacactctcaatcattta
 ttattcatatcatcggttatataagttaaatcttaaatctatagcacaatcacattatccattctg
 gcaatgataatctcaacttcacttataattacagccatcatattcatagcctcggaaccacaaaagtc
 aactaacaactgcaatcatacaagatgcaacaagccagatcaagaacacaaccccaacatacctcact
 caggatcctcagcttggaaatcagcttctccaatctgtctgaaattacatcacaaccaccaccatacta

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Seq ID NO:7

Secuencia de Nucleótidos que codifica PreFG_V1 optimizado para CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgcccgtgacc
 ctgtgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagttctaccagtcacactgctccgcccgtgtccaag
 5 ggctacctgtccgcccctgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaa
 gaaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagc
 gccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttc
 ctgctgggctgggctccgcccctgcctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggcgag
 gtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtcc
 10 gtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaag
 cagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacccggctgctggag
 atcacccgcgagttctccgtgaacgcccggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaaactcc
 gagctgctctccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccaaaaaaagctgatgtccaacaacgtg
 cagatcgctgcccgcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtg
 15 cagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttctgtggaagctgcacacctccccctgtgcaccacc
 aacaccaaagaggggtccaacatctgcctgacccggaccgacgggggtggtactgcgacaacgccggc
 tccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaacggggtgttctgcgacaccatg
 aactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtacgactgc
 aagatcatgaccagcaagaccgacgtgtccctccagcgtgatcacctccctgggcccacatcgtgtcctgc
 20 tacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaacccgggaatcatcaagaccttctccaacggctgc
 gactacgtgtccaataagggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcag
 gaaggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtgttcccttcc
 gacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtccttggccttcatccggaag
 tccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccacatcgag
 25 aacgagatcgcccgatcaagaagctgatcgccgaggtggcggtcttggcggcagcggcggtccaag
 cagcggcagaacaagcctcctaacaagcccaacaacgacttccacttcgaggtgttcaacttcgtgcct
 tgctccatctgctccaacaaccctacctgctgggccatctgcaagagaatccccaacaagaagcctggc
 aagaaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcag
 accacaaagcctaaggaagtgccaccaccaagcaccaccacctaccactgataatcta

Seq ID NO:8

Péptido PreFG_V1 para CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVLIKQELDKYKSAVTELQLMQSTPATNNKKFLGLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKI
 35 KSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITRE
 FSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTTRTDGRWYSDRGNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLT
 LPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEK
 40 LHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEAGSGSGSGSKQRQNKPPNKNPNDFHFEVFNFPVPCSI
 SNNPTCWAICKRIPNKKPGKKT'TTKPTKKPTFKTTKKDHKPQTTKPKEVP'TTK

Seq ID NO:9

Secuencia de Nucleótidos que codifica PreFG_V2 para CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgcccgtgacc
 ctgtgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagttctaccagtcacactgctccgcccgtgtccaag
 45 ggctacctgtccgcccctgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaa
 gaaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagc
 gccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttc
 50 ctgctgggctgggctccgcccctgcctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggcgag
 gtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtcc
 gtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaag
 cagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacccggctgctggag
 atcacccgcgagttctccgtgaacgcccggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaaactcc
 55 gagctgctctccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccaaaaaaagctgatgtccaacaacgtg

5 cagatcgtgcgccgagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtg
 cagctgcctctgtacggcggtgatcgacaccccttgcctggaagctgcacacccctccccctgtgcaccacc
 aacaccaaagagggctccaacatctgctgacccggaccgacccgggctggtactgcgacaacgccggc
 tccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaacccgggtgttctgcgacacccatg
 10 aactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtacgactgc
 aagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcggtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgc
 tacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaacccgggaatcatcaagaccccttctccaacggctgc
 gactacgtgtccaataagggcggtggacacccgtgtcctgggcaacacactgtactacgtgaataagcag
 gaaggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacccctctgggtgttcccttcc
 15 gacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagagatcaaccagtcctggccttcatccggaag
 tccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccacatcgag
 aacgagatcgcccgatcaagaagctgatcgccgagggctggcggaagcagcggcagaacaagcctcct
 aacaagcccaacaacgacttccacttccgaggtgttcaacttctgctccttgcctcatctgtccaacaac
 cctacctgtgtggccatctgcaagagaatcccccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcct
 20 accaagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaaagcctaaggaagtgc
 ccaaccaccaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

Seq ID NO:10

Péptido PreFG_V2 para CHO

20 MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELOLLMQSTPATNNKKFLGLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVVKI
 KSALLSTNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQKNNRLLLEITRE
 FSVNAGVTPPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQSYSIMSIIEEVLAYVVLPL
 25 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSLNCLTRTDGWDYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLT
 LPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSGNCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEK
 LHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEAGGKQFQNKPPNPNDFHFEVFNFPVPCSICSNNPTCW
 AICKRIPNKKPGKTTTKPTKKPTFKTTKKDHKPPQTTKPKVPTTK

30 SEQ ID NO:11

Hélice enrollada ejemplar (cremallera de isoleucina)
 EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

SEQ ID NO:12

35 Polinucleótido de antígeno PreF CHO2

atggagctgcccacctgaagaccaacgccatcaccaccatcctcgccgcctgacccctgtgcttcgcc
 agcagccagaacatcacggaggagttctaccagagcacgtgcagcgccgtgagcaagggctacctgagc
 gcgctgcgcacgggctggtacacgagcgtgatcacgatcgagctgagcaacatcaaggagaacaagtgc
 40 aacggcacggacgcgaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcggtgacggag
 ctgcagctgctgatgcagagcacgcggcgacgaacaacaagttcctcggttccctgctggcggtgggc
 agcgcgatcgcgagcggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaag
 tccgcgctgctgagcagcaacaaggcggtcgtgagcctgagcaacggcggtgagcgtgctgacgagcaag
 gtgctcgacctgaagaactacatcgacaagcagctgctgccgatcgtgaacaagcagagctgcagcatc
 45 agcaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccgcctgctggagatcacgcgggagttc
 tccgtgaacgcaggcggtgacgacgcccgtgtctacgtacatgctgacgaacagcagctgctcagcctg
 atcaacgacatgccgatcacgaacgaccagaagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtgcgccag
 cagagctacagcatcatgagcatcatcaaggaggaggtgctggcatacgtgggtgcagctgccgctgtac
 ggcgtcatcgacacgccttgcgtggaagctgcacacgagcccgctgtgcacgaccaacacgaaggagggc
 50 agcaacatctgcctgacgcggacggaccggggtggtactgcgacaacgcgggcagcgtgagcttcttc
 ccgctcgcgagacgtgcaaggtgcagagcaaccgcgtcttctgcgacacgatgaacagcctgacgctg
 ccgagcgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacccgaagtacgactgcaagatcatgacgagc
 aagaccgatgtcagcagcagcgtgatcacgagcctcgccgcgatcgtgagctgctacggcaagacgaag
 tgcacggcgagcaacaagaaccgcggcatcatcaagacgttcagcaacggctgcgactatgtgagcaac
 aagggcggtggacactgtgagcgtcggaacacgctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagagcctg
 55 tacgtgaagggcgagccgatcatcaacttctacgaccgcctcgtgttcccagcgacgaggttcgacgcg

117

agcatcagccaagtgaacgagaagatcaaccagagcctggcggttcacccgcaagagcgacgagaagctg
cacaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatcgcgcg
atcaagaagctgatcggcgaggcgcatcatcaccatcaccattga

5 SEQ ID NO:13

Polinucleótido del antígeno PreF con intrón

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctggccgccgtgacctgtgcttcgcc
tctcccagaacatcacccgaggagttctaccagtccacctgctccgccgtgtccaagggctacctgtcc
gcccctgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgc
10 aacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa
ctccagctgctgatgcagtcacccccctgccaccaacaacaagtttctgggcttcctgctgggctgggc
tccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtacgtgtcgggacttgtgttcccccttttttaata
aaaagttatatctttaatgttatatacatatttctgtatgtgatccatgtgcttatgactttgtttat
catgtgttttaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaaca
15 aggcctggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactaca
tcgacaagcagctgctgcctatcgtgaaccaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcg
agttccagcagaagaacaacccgctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgcccgtgacca
ccccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcacca
acgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagca
20 tcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccccttgc
ggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgacccgga
ccgaccggggctggtactgcgacaacgcccgtccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaagg
tgcagtcacaacccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgca
acatcgacatcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcg
25 tgatcacctccctgggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaacc
ggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggacaccgtgtccg
tgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatca
tcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgaga
agatcaaccagtccttggccttcatccggaagtcgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcg
30 aggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgccggatcaagaagctgatcggcgagg
ccggaggtcaccaccaccatcaccactga

SEQ ID NO:14

Secuencia enlazadora sintética

35 GSGSGSGS

SEQ ID NO:15

Sitio de digestion de furina

RARR

40

SEQ ID NO:16

Sitio de digestion de furina

RKRR

45 SEQ ID NO:17

Secuencia de nucleótidos que codifica PreF_NGTL

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctggccgccgtgacctgtgcttcgcc
tctcccagaacatcacccgaggagttctaccagtccacctgctccgccgtgtccaagggctacctgtcc
gcccctgcggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgc
50 aacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa
ctccagctgctgatgcagtcacccccctgccaccaacaacaagtttctgggcttcctgctgggctgggc
tccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaag
agcgccctgctgtccaccaacaaggcctggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaag
gtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatc
55 tccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacccgctgctggagatcacccgcgagttc

tccgtgaacgcccggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctg
 atcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcag
 cagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtac
 5 ggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggc
 tccaacatctgcctgaccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgcgggtccgtgtccttcttc
 cctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaacgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctg
 ccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccccaagtaagactgcaagatcatgaccagc
 aagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaag
 10 tgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaat
 aagggtggtgacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggcaagagcctg
 tacgtgaagggtgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgcc
 tccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccgggacctggccttcatccggaagtccgacgagaagctg
 cataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccg
 15 atcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO:18
 Secuencia de aminoácidos de PreF_NGTL
 MELLILKTNAILTAALAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 20 NGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKIK
 SALLSTNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF
 SVNAGVTPPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLY
 GVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL
 PSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSN
 25 KGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKL
 HNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

SEQ ID NO:19
 Secuencia de nucleótidos que codifica PreF_L112Q
 atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccccatcctggcgcgcgtgacctgtgcttcgcc
 30 tctcccagaacatcaccgaggagttctaccagtcacacctgctccgcgcgtgtccaagggctacctgtcc
 gccctgcggaccggctggtacacctccgtgatcacatcgagctgtccaacatcaaggaacaagtgcc
 aacggcaccgacccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcgcgtgaccgaa
 cctcagctgctgatgcagtcacccctgcccaccaacaacaagtttctgggcttccgtgagggcggtgggc
 35 tccgccatcgctcccgcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaag
 agcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgctgtccgtgtgacctccaag
 gtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatc
 tccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacggctgctggagatcacccgcgagttc
 tccgtgaacgcccggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctg
 40 atcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcag
 cagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtac
 ggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggc
 tccaacatctgcctgaccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgcgggtccgtgtccttcttc
 cctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaacgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctg
 45 ccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccccaagtaagactgcaagatcatgaccagc
 aagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaag
 tgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaat
 aagggtggtgacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggcaagagcctg
 tacgtgaagggtgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgcc
 50 tccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcatccggaagtccgacgagaagctg
 cataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccg
 atcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO:20
 Secuencia de aminoácidos de PreF_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIK
 SALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF
 SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLY
 5 GVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL
 PSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSN
 KGVDTVSVGNTRYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKL
 HNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

10 SEQ ID NO:21

Secuencia de nucleótidos que codifica Pref_NGTL_L112Q

atggagctgctgatcctgaaaaccaacyccatcaccgccatcctggccgctgacccctgtgcttcgcc
 tcctcccagaacatcaccgaggagttctaccagtcacccctgctccgctgtccaagggctacctgtcc
 gccctgcggaccggtggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgc
 15 aacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa
 ctccagctgctgatgcagtcacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttcctgcagggcggtgggc
 tccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaag
 agcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcggtgtccgtgctgacctccaag
 gtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatc
 20 tccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttc
 tccgtgaacgcccgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctg
 atcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcag
 cagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtac
 ggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggc
 25 tccaacatctgcctgaccggaccgacggggctggtactgcgacaacgcccgtccgtgtccttcttc
 cctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctg
 ccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagc
 aagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaag
 tgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaat
 30 aagggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggcaagagcctg
 tacgtgaagggcgagcctatcatcaacitctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgcc
 tccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggaccttgccctcatccggaagtccgacgagaagctg
 cataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccg
 35 atcaagaagctgatcggcgaggcc

35 SEQ ID NO:22

Secuencia de aminoácidos de Pref_NGTL_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIK
 40 SALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF
 SVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLY
 GVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL
 PSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSN
 KGVDTVSVGNTRYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKL
 45 HNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un antígeno de virus de sincicio respiratorio (RSV) recombinante que comprende un polipéptido de proteína F soluble que comprende un dominio F2 y un dominio F1 de un polipéptido de proteína F de RSV, en donde el polipéptido de proteína F comprende por lo menos una modificación que altera la glicosilación.

10 2.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el polipéptido de proteína F soluble comprende por lo menos una modificación seleccionada de: (i) una adición de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo; (ii) una deleción de por lo menos un sitio de digestión
15 de furina; (iii) una deleción de por lo menos un sitio de no digestión de furina; (iv) una deleción de uno o más aminoácidos del dominio pep27; y (v) por lo menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrofílico en un dominio hidrofóbico del dominio extracelular de proteína F.

20 3.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la modificación que altera la glicosilación comprende una sustitución de uno o más aminoácidos que comprenden y/o adyacentes al aminoácido correspondiente a la posición 500 de SEQ ID NO:2.

4.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 1 ó 3, caracterizado además porque aminoácidos correspondientes a las posiciones 500-502 de SEQ ID NO:2 se seleccionan de: NGS; NKS; NGT; NKT.

5 5.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado además porque la modificación que altera la glicosilación comprende una sustitución de glutamina en el aminoácido correspondiente a la posición 500 de SEQ ID NO:2.

10 6.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado además porque el polipéptido de proteína F soluble comprende un péptido de fusión intacto entre el dominio F2 y el dominio F1.

15 7.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado además porque la por lo menos una modificación comprende la adición de un secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de trimerización heterólogo.

20 8.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque el dominio de trimerización heterólogo está ubicado C-terminal al dominio F1.

9.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado además porque comprende un F2 dominio y un dominio F1 sin un sitio de digestión de furina

intermedio.

10.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado además porque el antígeno de RSV se ensambla en un multímero.

5 11.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado además porque el antígeno de RSV se ensambla en un trimero.

12.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado además porque el
10 dominio F2 comprende por lo menos una porción de un polipéptido de proteína F de RSV correspondiente a los aminoácidos 26-105 del polipéptido de precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

13.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y caracterizado además porque el
15 dominio F1 comprende por lo menos una porción de un polipéptido de proteína F de RSV correspondiente a los aminoácidos 137-516 del polipéptido de precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

14.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado además porque el
20 dominio F2 comprende un polipéptido de proteína F de RSV correspondiente a los aminoácidos 26-105 y/o en donde el dominio F1 comprende un polipéptido de proteína F de RSV correspondiente a los aminoácidos 137-516 del polipéptido de precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

15.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizado además porque el antígeno de RSV se selecciona el grupo de: a) un polipéptido que comprende SEQ ID NO:22; b) un polipéptido codificado por SEQ ID NO:21 o por una
5 secuencia de polinucleótido que hibrida bajo condiciones astringentes sobre sustancialmente su longitud entera a SEQ ID NO:21; c) un polipéptido con por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:22.

16.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizado además porque el
10 dominio F2 comprende aminoácidos 1-105 del polipéptido de proteína F de RSV.

17.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, caracterizado además porque el dominio F2 y el dominio F1 están ubicados un péptido de fusión intacto y sin
15 un dominio pep27 intermedio.

18.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, caracterizado además porque el dominio de trimerización heterólogo comprende un dominio de hélice enrollada.

20 19.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado además porque el dominio de multimerización comprende una cremallera de isoleucina.

20.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la

reivindicación 19, caracterizado además porque el dominio de cremallera de isoleucina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

21.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado además porque el antígeno de RSV comprende por lo menos una sustitución o adición de un aminoácido hidrofílico en un dominio hidrofóbico del dominio extracelular de proteína F.

22.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque el dominio hidrofóbico es el dominio de hélice enrollada HRB del dominio extracelular de proteína F.

23.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado además porque el dominio de hélice enrollada HRB comprende la sustitución de un residuo cargado en lugar de un residuo neutro en la posición correspondiente al aminoácido 512 del precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

24.- El antígeno de RSV de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque el dominio de hélice enrollada HRB comprende una sustitución de lisina o glutamina para leucina en la posición correspondiente al aminoácido 512 del precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

25.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque el dominio hidrofóbico es el dominio HRA del dominio extracelular de proteína F.

26.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque el dominio HRA comprende la adición de un residuo cargado después de la posición correspondiente al aminoácido 105 del precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

27.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque el dominio HRA comprende la adición de una lisina después de la posición correspondiente al aminoácido 105 del precursor de proteína F de referencia (F0) de SEQ ID NO:2.

28.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21-27, caracterizado además porque el antígeno de RSV comprende por lo menos una primera sustitución o adición de un aminoácido hidrofílico en el dominio HRA y por lo menos una segunda sustitución o adición de un aminoácido hidrofílico en el dominio HRB del dominio extracelular de proteína F.

29.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, caracterizado además porque el antígeno de RSV comprende por lo menos una adición, delección o sustitución de aminoácido que elimina un sitio de digestión de furina presente en un precursor de proteína F que ocurre naturalmente (F0).

30.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado además porque el antígeno de RSV comprende una adición, delección o sustitución de aminoácido que elimina un

sitio de digestión 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 (F0) de SEQ ID NO:2.

5 31.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, caracterizado además porque los dominios de polipéptido F1 y F2 corresponden en secuencia a la cepa RSV A Long.

10 32.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, caracterizado además porque el antígeno de RSV comprende un multímero de polipéptidos.

33.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, caracterizado además porque el antígeno de RSV comprende un trímero de polipéptidos.

15 34.- Una composición inmunogénica que comprende el antígeno de RSV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-33, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 35.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 34, caracterizada además porque comprende adicionalmente un adyuvante.

36.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada además porque el adyuvante comprende por lo menos uno de: 3D-MPL, QS21, una emulsión de aceite en agua, y alumbre.

122

37.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada además porque el adyuvante comprende una emulsión de aceite en agua.

5 38.- La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 36 ó 37, caracterizada además porque la emulsión de aceite en agua comprende un tocol.

39.- La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36-38, caracterizada además porque la emulsión de aceite en agua comprende menos de 5 mg de escualeno por
10 dosis humana.

40.- La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 35-39, caracterizada además porque el adyuvante es adecuado para administrarse a un neonato.

41.- La composición inmunogénica de conformidad con
15 cualquiera de las reivindicaciones 34-40, caracterizada además porque cuando la composición inmunogénica comprende el antígeno de RSV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 la composición inmunogénica además comprende un polipéptido de proteína G que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones
20 de aminoácido 149 a 229 de un polipéptido de proteína G de RSV.

42.- La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34-41, caracterizada además porque comprende adicionalmente por lo menos un antígeno adicional de un

organismo patológico distinto de RSV.

43.- Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica el antígeno de RSV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-33.

5 44.- El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado además porque la secuencia de polinucleótido que codifica el antígeno de RSV es optimizado en codón para expresión en una célula hospedera seleccionada.

10 45.- El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 43 ó 44, caracterizado además porque el ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada de: a) una secuencia de polinucleótido que comprende SEQ ID NO:21; b) una secuencia de polinucleótido que codifica SEQ ID NO:22; c) una secuencia de polinucleótido que hibrida bajo condiciones astringentes sobre sustancialmente su longitud entera a SEQ ID
15 NO:21; d) una secuencia de polinucleótido con por lo menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:21, dicha secuencia de polinucleótido no corresponde a una cepa de RSV que ocurre naturalmente.

 46.- Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 43-45.

20 47.- Una célula hospedera que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 43 ó 44 o el vector de la reivindicación 46.

 48.- El uso del antígeno de RSV de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 en la preparación de un medicamento para tratar una

infección de RSV.

49.- El uso del antígeno de RSV o ácido nucleico de la reivindicación 48, en donde el medicamento se administra para el propósito de tratar profilácticamente una infección de RSV.

5 50.- Un método para producir una respuesta inmunológica contra virus de sincicio respiratorio (RSV), el método comprende: administrar a un sujeto una composición que comprende el antígeno de RSV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 34-42.

10 51.- El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado además porque la administración de la composición que comprende el antígeno de RSV produce una respuesta inmunológica específica para RSV sin incrementar enfermedad viral después de contacto con RSV.

15 52.- El método de conformidad con la reivindicación 50 ó 51, caracterizado además porque la respuesta inmunológica comprende una respuesta inmunológica protectora que reduce o previene infección con un RSV y/o reduce o previene una respuesta patológica después de infección con un RSV.

20 53.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 50-52, caracterizado además porque el sujeto es un sujeto humano.

54.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 34-42 para usarse en medicina.

55.- El antígeno de RSV recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 34-42 para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con RSV.

56.- Un método para producir un antígeno de RSV recombinante con un patrón de glicosilación alterado, el método comprende: (i) expresar un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 43-45 en una célula hospedera; y (ii) aislar el antígeno de RSV recombinante expresado por el mismo.

57.- Un método para incrementar la expresión de un polipéptido de proteína de fusión de RSV, el método comprende: expresar en una célula hospedera un ácido nucleico que codifica un polipéptido de proteína de fusión de RSV que comprende por lo menos una mutación que produce una adición, delección o sustitución de aminoácido, dicha adición, delección o sustitución de aminoácido altera un sitio de glicosilación del polipéptido de proteína de fusión de RSV codificado en comparación con una proteína de fusión de RSV que ocurre naturalmente, por lo que la alteración del sitio de glicosilación incrementa la expresión del polipéptido de proteína de fusión de RSV en comparación con una proteína de fusión de RSV sin la adición, delección o sustitución de aminoácido.

58.- El método de conformidad con la reivindicación 57,

caracterizado además porque el ácido nucleico que codifica el polipéptido de proteína de fusión de RSV además comprende una mutación adicional que produce una adición, deleción o sustitución de aminoácido que elimina un sitio de digestión de peptidasa dentro del polipéptido de proteína de fusión de RSV codificado.

59.- El método de conformidad con la reivindicación 57 ó 58, caracterizado además porque el polipéptido de proteína de fusión de RSV es un polipéptido de proteína de fusión recombinante estabilizado en la conformación de prefusión.

10

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta descripción provee antígenos de virus de sincicio
respiratorio (RSV) recombinante y métodos para hacerlos y usarlos,
5 incluyendo composiciones inmunogénicas (v.gr., vacunas) para el tratamiento
y/o prevención de infección de RSV.

10

15

20 9B

P11/1597F

125

FIG. 1A

N-glyc
F2
pep27
PÉPTIDO DE FUSIÓN
F1
N-Glyc
TM
LÍPIDO

574 aa

FIG. 1B

N-glyc N-Glyc PÉPTIDO DE FUSIÓN F1 N-Glyc HÉLICE ENROLLADA AGREGADA

Sp

F2

514 aa

N-glyc N-Glyc PÉPTIDO DE FUSIÓN F1 N-Glyc HÉLICE ENROLLADA AGREGADA

Sp

F2

REGIÓN CENTRAL DE PROTEÍNA G

126

CARACTERIZACIÓN HIDRODINÁMICA DE PreF Y FG
ELUCIÓN DE FG Rix POR FFF-MALLS - INYECCIÓN 100 mcl.
REGULADOR DE pH : 1X PBS, pH 7.4

FG
COEFICIENTE DE EXTINCIÓN
MOLAR DESCONOCIDO, POR LO
TANTO, PROPORCIÓN
DESCONOCIDA

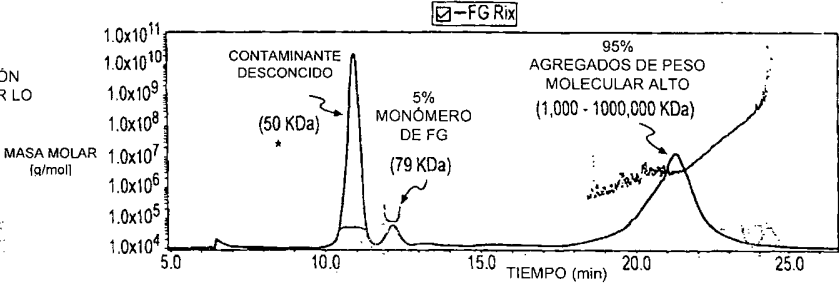
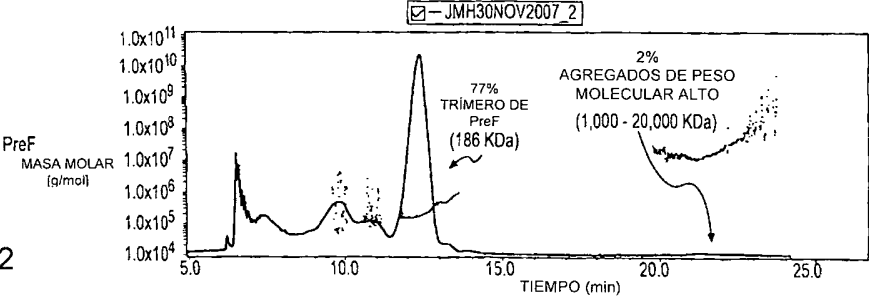


FIG. 2



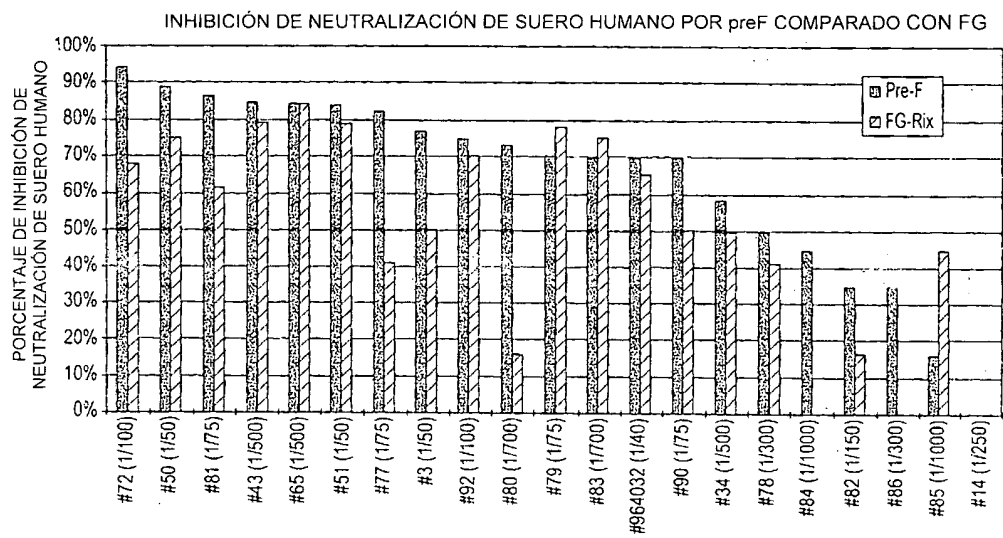


FIG. 3

FIG. 4A

SEROLOGÍA EN RATONES INMUNIZADOS, CHO-preF

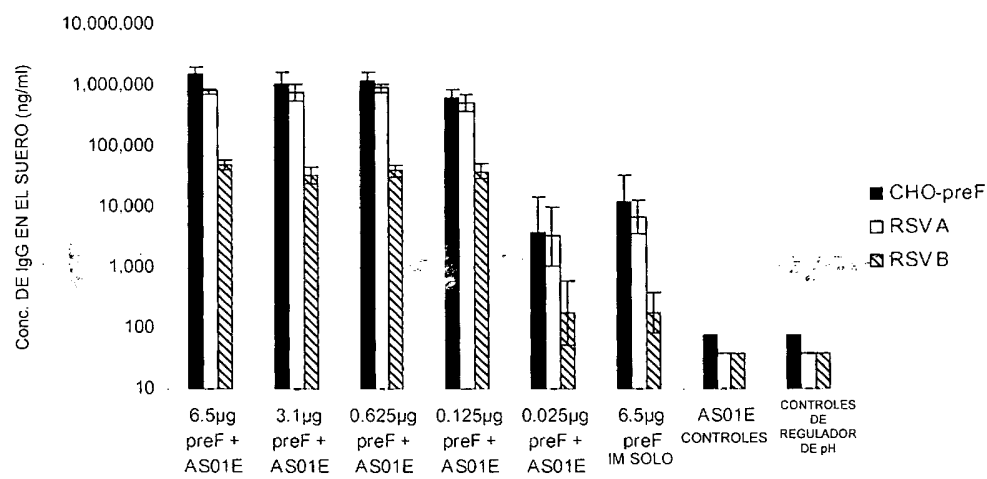


FIG. 4B

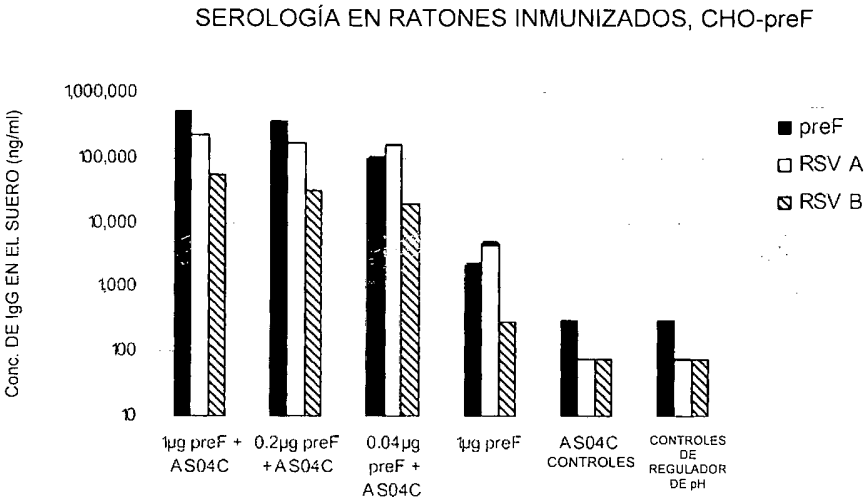


FIG. 5A

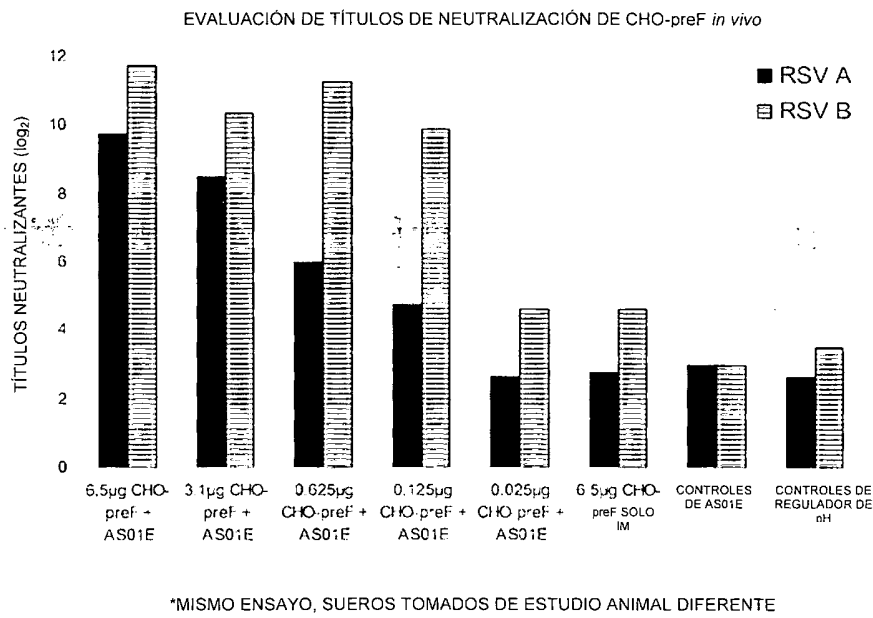
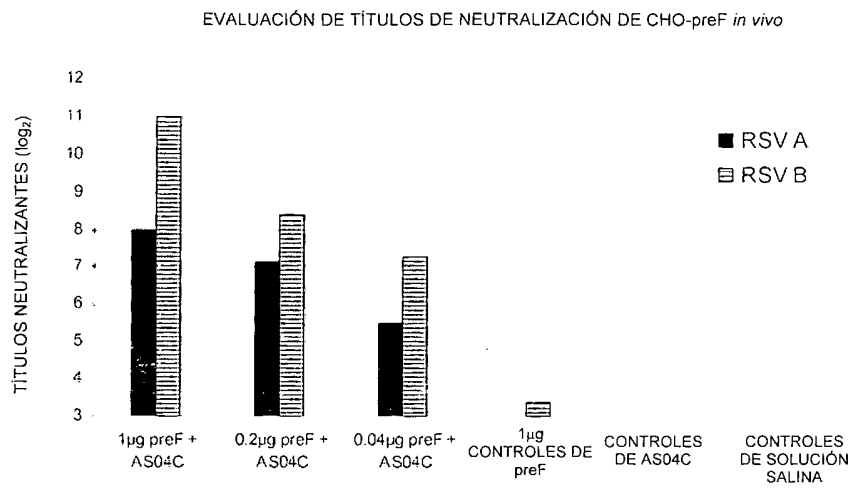


FIG. 5B



121

FIG. 6A

PROTECCIÓN DE CHO-pref CONTRA DESAFÍO

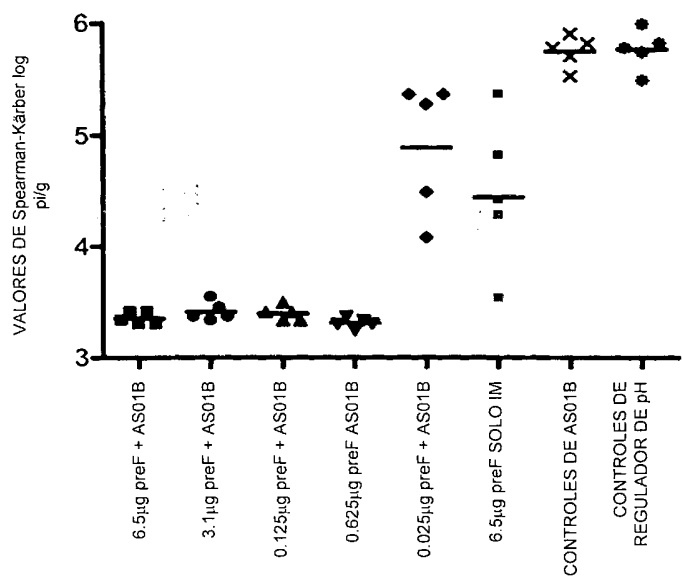


FIG. 6B

PROTECCIÓN DE CHO-PRF CONTRA DESAFÍO

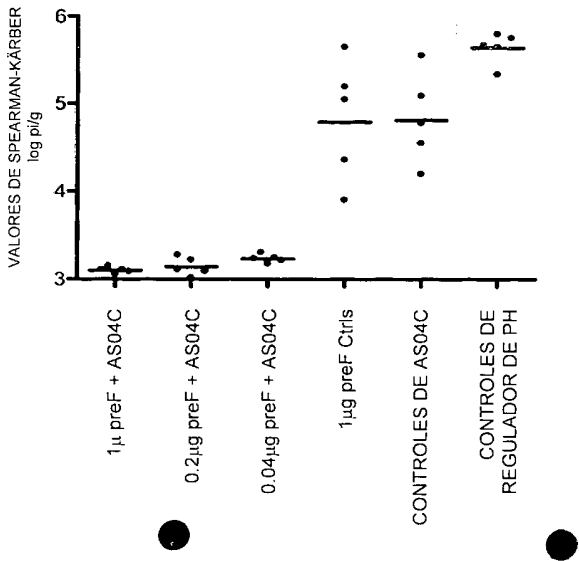


FIG. 7

RECLUTAMIENTO DE EOSINÓFILOS PULMONARES DESPUÉS DE DESAFÍO EN RATONES

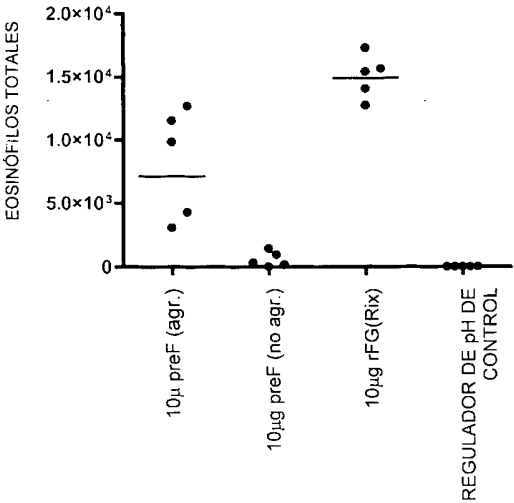


FIG. 8

NIVELES DE IgG EN EL SUERO EN RATONES INMUNIZADOS CON PREF
FORMULADO CON UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA

ESTUDIO 5614-82R (200080362)
NIVELES DE IgG EN EL SUERO CONTRA RSV A

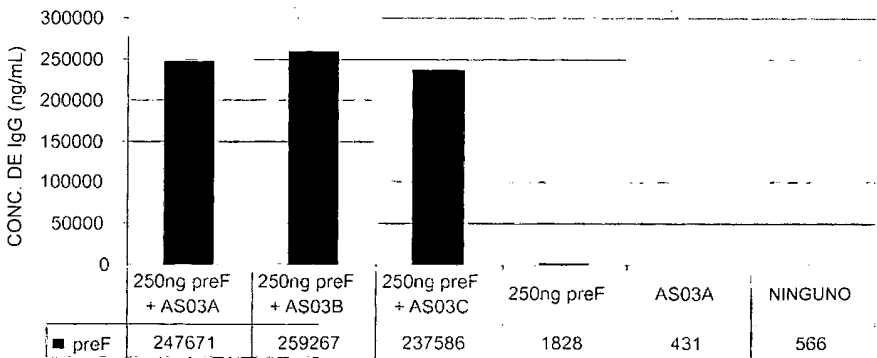
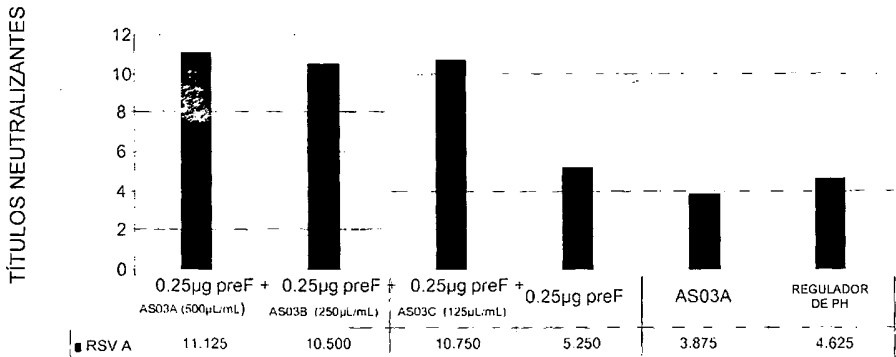


FIG. 9
TÍTULOS DE ANTICUERPO NEUTRALIZANTE EN RATONES INMUNIZADOS CON PREF
FORMULADO CON UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA

NEUTRALIZACIÓN DE RSV EN EL SUERO, ESTUDIO 20080362



PROTECCIÓN CONTRA DESAFÍO EN RATONES INMUNIZADOS CON PREF
FORMULADO CON UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA
TITULACIÓN DE RSV EN HOMOGENIZADOS DE PULMÓN DE RATONES
DESAFIADOS
SPEARMAN-KARBER FORMULA (WITH GEOMETRIC MEAN) - FÓRMULA
SPEARMAN-KARBER (CON MEDIA GEOMETRICA)

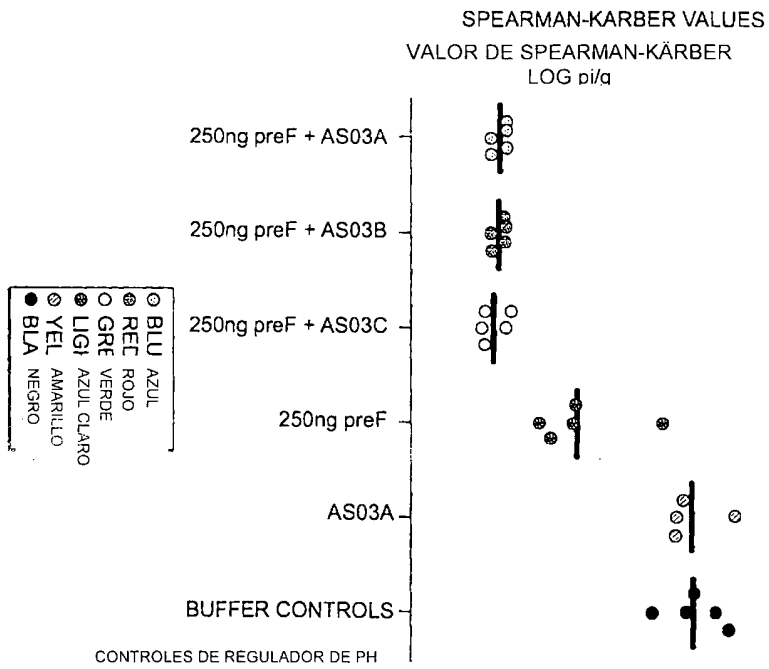


FIG. 10

eolf-othd-000002.txt
SEQUENCE LISTING

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

<120> Recombinant RSV Antigens

<130> VU62788-1 PCT

<150> 61/219,964

<151> 2009-06-24

<150> 61/334,568

<151> 2010-05-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1697

<212> DNA

<213> respiratory syncytial virus

<400> 1

atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt	60
gttttgcttc tgggtcaaac atcactgaag aattttatca atcaacatgc agtgcagtag	120
caaaggctat cttagtgtc tgagaactgg ttggtatacc agtggtataa ctatagatta	180
agtaatatca aggaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag	240
aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcaccacgc	300
aacaaacaat cgagccagaa gagaactacc aagggtttatg aattatacac tcaaaatgcc	360
aaaaaaacca atgtaacatt aagcaagaaa aggaaaagaa gatttcttgg tttttgtag	420
gtgttgatc tgcaatcgcc agtggcggtg ctgtatctaa ggtcctgcac ctgaagggga	480
agtgaacaag atcaaaagtg ctctactatc cacaacaag gctgtagtca gttatcaa	540
ggagttagt tcttaaccag caaagtgtta gacctcaaaa actatataga aaacaattgt	600
tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agcaactgta tagagttcca	660
acaaaagaac aacagactac tagagattac cagggaattt agtgtaagc aggtgtaact	720
acacctgtaa gcacttacat gttaactaat agtgaattat tgtcattatc aatgatatgc	780
ctataacaaa tgatcagaaa aagttaatgt ccaacaatgt tcaaatgtta gacagcaaag	840
ttactctatc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtgtaca attaccacta	900
tatgggtgtta tagatacacc ctgttggaac ctacacacat cccctatgt acaaccaaca	960
caaaagaagg gtccaacatc tgtttaacaa gaactgacag aggtggtact gtgacaatgc	1020

Página 1

133

aggatcagta tctttcttcc cacaagctga aacatgtaaa gtcaatcaaa tcgagtattt 1080
 tgtgacacaa tgaacagttt aacattacca agtgaagtaa actctgcaat gttgacatat 1140
 tcaaccccaa atatgattgt aaaattatga cttcaaaaac gatgtaagca gctccgttat 1200
 cacatctcta ggagccattg tgtcatgcta tggcaaaaca aatgtacagc atccaataaa 1260
 aatcgtggaa tcataaagac attttctaac ggggtgcgata tgtatcaaata aaaggggtgg 1320
 acactgtgtc tgtaggtaac acattatatt atgtaaaaag caagaaggta aaagtctcta 1380
 tgtaaaaggt gaaccaataa taaatttcta tgacccttag tattcccctc tgatgaattt 1440
 gatgcatcaa tatctcaagt caacgagaag attaacagag cctagcattt attcgtaaata 1500
 ccgatgaatt attacataat gtaaattgctg gtaatccacc ataaatatca tgataactac 1560
 tataattata gtgattatag taatattgtt atcttaattg ctgttggact gctcttatac 1620
 tgtaaggcca gaagcacacc agtcacacta agaaagatca actgagtggg ataaataata 1680
 ttgcatttag taactaa 1697

<210> 2
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus

<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

134

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
 370 375 380 385 390

370

375

380

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 897
<212> DNA
<213> respiratory syncytial virus

<400> 3
atgtccaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagacctg ggacactctc 60
aatcatttat tattcatatc atcgggctta tataagttaa atcttaaadc tatagcacia 120
atcacattat ccattctggc aatgataatc tcaacttcac ttataattac agccatcata 180

ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ctaacaactg caatcataca agatgcaaca	240
agccagatca agaacacaac cccaacatac ctactcagg atcctcagct tggaatcagc	300
ttctccaatc tgtctgaaat tacatcacia accaccacca tactagcttc aacaacacca	360
ggagtcaagt caaacctgca acccacaaca gtcaagacta aaaacacaac aacaacccaa	420
acacaacca gcaagcccac taaaaaaca cgccaaaaca aaccaccaa caaaccaat	480
aatgattttc acttcgaagt gtttaacttt gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca	540
acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc	600
aagcctacaa aaaaaccaac cttcaagaca accaaaaaag atctcaaacc tcaaaccact	660
aaaccaaagg aagtaccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccacaaa	720
acaaacatca caactacact gtcaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt	780
caaatggaaa cttccactc aacctcctcc gaaggcaatc taagcccttc tcaagtctcc	840
acaacatccg agcaccatc acaaccctca tctccacca acacaacacg ccagtag	897

<210> 4
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr 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> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Recombinant PreF polynucleotide

<400> 5
aagcttgcca ccatggagct gctgatcctg aaaaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60
gccgtgaccc tgtgcttcgc ctctccag aacatcaccg aggagttcta ccagtccacc 120
tgctccgccg tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggttggtta cacctccgtg 180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaggaa aacaagtgca acggcaccga cgccaagggtg 240
aagctgatca agcaggagct ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300

```

atgcagtgcca cccctgccac caacaacaag tttctgggct tcctgctggg cgtgggctcc      360
gccatgcctt ccggcatcgc cgtgagcaag gtgctgcacc tggagggcga ggtgaacaag      420
atcaagagcg ccttgcgtgc caccaacaag gccgtggtgt ccctgtccaa cggcgtgtcc      480
gtgctgacct ccaaggtgct ggatctgaag aactacatcg acaagcagct gctgcctatc      540
gtgaacaagc agtcctgctc catctccaac atcgagaccg tgatcgagtt ccagcagaag      600
aacaaccggc tgcctgggat caccgcgag ttctccgtga acgccggcgt gaccaccctt      660
gtgtccacct acatgctgac caactccgag ctgctgtccc tgatcaacga catgcctatc      720
accaacgacc agaaaaaact gatgtccaac aacgtgcaga tcgtgcggca gcagtcctac      780
agcatcatga gcatcatcaa ggaagaggtg ctggcctacg tgggtgcagct gcctctgtac      840
ggcgtgatcg acacccttg ctggaagctg cacacctccc ccctgtgcac caccaacacc      900
aaggagggtt ccaacatctg cctgaccggg accgaccggg gctggtactg cgacaacgcc      960
ggctccgtgt ctttcttccc tctggccgag acctgcaagg tgcagtccaa cggggtgttc     1020
tgcgacacca tgaactccct gaccctgcct tccgaggtga acctgtgcaa catcgacatc     1080
ttcaacccca agtacgactg caagatcatg accagcaaga ccgacgtgtc ctccagcgtg     1140
atcacctccc tgggcgccat cgtgtcctgc tacggcaaga ccaagtgcac cgctccaac      1200
aagaaccggg gaatcatcaa gaccttctcc aacggctgcg actacgtgtc caataagggc     1260
gtggacaccg tgtccgtggg caacacactg tactacgtga ataagcagga gggcaagagc     1320
ctgtacgtga agggcgagcc tatcatcaac ttctacgacc ctctggtgtt cccttccgac     1380
gagttcgacg cctccatcag ccaggtgaac gagaagatca accagtcctt ggccttcac      1440
cggaagtccg acgagaagct gcataacgtg gaggacaaga tcgaggagat cctgtccaaa     1500
atctaccaca tcgagaacga gatcgcccgg atcaagaagc tgatcggcga ggcctgataa     1560
tctaga                                             1566

```

```

<210> 6
<211> 514
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Recombinant PreF Antigen
<400> 6

```

```

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

```

139

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

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

1d1

<211> 1855
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric PreF-G Antigen polynucleotide sequeunce

<400> 7
 aagcttgcca ccatggagct gctgattctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60
 gccgtgacct tgtgcttcgc ctctccag aacatcaccg aagagttcta ccagtcacc 120
 tgctccgccg tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg 180
 atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgc acggcaccga cgccaaggtc 240
 aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300
 atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttctgtct gggcgtgggc 360
 tccgccatcg cctccggcat cgccgtgagc aagggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac 420
 aagatcaaga ggcacctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgacctgtc caacggcgtg 480
 tccgtgctga cctccaaggt gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgcct 540
 atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag 600
 aagaacaacc ggctgctgga gatcaccgc gagttctccg tgaacgccgg cgtgaccacc 660
 cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct cctgatcaa cgacatgcct 720
 atcaccaacg accaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc 780
 tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtccctggcct acgtcgtgca gctgcctctg 840
 tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct ccccccctgtg caccaccaac 900
 accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac 960
 gccggctccg tgctcttctt cctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg 1020
 ttctgcgaca ccatgaactc cctgaccctg ccttccgagg tgaacctgtg caacatcgac 1080
 atcttcaacc ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtctccagc 1140
 gtgatcacct ccttgggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc 1200
 aacaagaacc ggggaatcat caagaccttc tccaacggct gcgactacgt 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 cgagatgcc cgatcaaga agctgatcgg cgaggctggc 1560
 ggctctggcg gcagcggcgg ctccaagcag cggcagaaca agcctcctaa caagcccaac 1620
 aacgacttcc acttcgaggt gttcaacttc gtgccttgct ccatctgctc caacaacct 1680

acctgctggg ccattctgcaa gagaatcccc aacaagaagc ctggcaagaa aaccaccacc 1740
aagcctacca agaagcctac cttcaagacc accaagaagg accacaagcc tcagaccaca 1800
aagcctaagg aagtgccaac caccaagcac caccaccatc accactgata atcta 1855

<210> 8
<211> 605
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Chimeric PreF-G polypeptide
<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
Página 11

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
 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> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric PreF-G polynucleotide

<400> 9
 aagcttgcca ccatggagct gctgaccc c aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60
 gccgtgaccc tgtgcttcgc ctccctccag aacatcaccg aagagttcta ccagtccacc 120
 tgctccgccc tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg 180
 atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaggtc 240
 aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300

eolf-othd-000002.txt

atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttcctgct gggcgtgggc	360
tccgccatcg cctccggcat cgccgtgagc aagggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac	420
aagatcaaga gcgccctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgtccctgtc caacggcgtg	480
tccgtgctga cctccaaggt gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgcct	540
atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag	600
aagaacaacc ggctgctgga gatcacccgc gagttctccg tgaacgccgg cgtgaccacc	660
cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct ccctgatcaa cgacatgcct	720
atcaccaacg accaaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtcc	780
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtccctggcct acgtcgtgca gctgcctctg	840
tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct ccccccctgtg caccaccaac	900
accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac	960
gccggctccg tgtccttctt ccctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg	1020
ttctgcgaca ccatgaactc cctgacctg ccttccgagg tgaacctgtg caacatcgac	1080
atcttcaacc ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtcctccagc	1140
gtgatcacct ccctgggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc	1200
aacaagaacc ggggaatcat caagacctc tccaacggct gcgactacgt 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 agctgatcgg cgaggctggc	1560
ggcaagcagc ggcagaacaa gcctcctaac aagcccaaca acgacttcca cttcgagggtg	1620
ttcaacttcg tgccttgctc catctgtctc aacaacccta cctgctgggc catctgcaag	1680
agaatcccca acaagaagcc tggcaagaaa accaccacca agcctacca gaagcctacc	1740
ttcaagacca ccaagaagga ccacaagcct cagaccacaa agcctaagga agtgccaacc	1800
accaagcacc accaccatca ccactgataa tcta	1834

<210> 10
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric PreF-G polypeptide

<400> 10

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

147

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

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

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

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

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

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

Glu Val Pro Thr Thr Lys
595

<210> 11
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Isoleucine substituted GCN4 leucine zipper
<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

<210> 12
<211> 1563
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Codon optimized PreF nucleotide sequence

<400> 12
atggagctgc ccacccctgaa gaccaacgcc atcaccacca tcctcgccgc cgtgaccctg 60
tgcttcgcca gcagccagaa catcacggag gagttctacc agagcacgtg cagcgccgtg 120
agcaagggct acctgagcgc gctgcgcacg ggctgggtaca cgagcgtgat cacgatcgag 180
ctgagcaaca tcaaggagaa caagtgaac ggcacggacg cgaaggtgaa gctgatcaag 240
caggagctgg acaagtacaa gagcgcgggtg acggagctgc agctgctgat gcagagcacg 300

149

ccggcgacga acaacaagtt cctcggcttc ctgctgggcg tgggcagcgc gatcgcgagc	360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagtccgcg	420
ctgctgagca cgaacaaggc ggtcgtgagc ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgacgagc	480
aagggtgctcg 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 cagagccccg ctgtgcacga ccaacacgaa ggagggcagc	900
aacatctgcc tgacgcggac ggaccggggc tgggtactgcg acaacgcggg cagcgtgagc	960
ttcttcccgc tcgcggagac gtgcaaggtg cagagcaacc gcgtcttctg cgacacgatg	1020
aacagcctga cgctgccgag cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccgaag	1080
tacgactgca agatcatgac gagcaagacc gatgtcagca gcagcgtgat cagagcctc	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> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> PreF polynucleotide sequence with intron

<400> 13	
atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcc tccctggccgc cgtgaccctg	60
tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccgtg	120
tccaagggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtcacc	300

```

cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctgggcg tgggctccgc catcgccctcc 360
ggcatcgccg tgagcaaggt acgtgtcggg acttgtgttc cccctttttt aataaaaagt 420
tatatcttta atgttatata catatttcct gtatgtgac catgtgctta tgactttgtt 480
tatcatgtgt ttaggtgctg cacctggagg gcgagggtgaa caagatcaag agcgccctgc 540
tgtccaccaa caaggccgtg gtgtccctgt ccaacggcgt gtccgtgctg acctccaagg 600
tgctggatct gaagaactac atcgacaagc agctgctgcc tatcgtgaac aagcagtcct 660
gctccatctc caacatcgag accgtgatcg agttccagca gaagaacaac cggctgctgg 720
agatcacccg cgagttctcc gtgaacgccg gcgtgaccac ccctgtgtcc acctacatgc 780
tgaccaactc cgagctgctg tccctgatca acgacatgcc taccaccaac gaccagaaaa 840
aactgatgtc caacaacgtg cagatcgtgc ggcagcagtc ctacagcatc atgagcatca 900
tcaaggaaga ggtgctggcc tacgtggtgc agctgcctct gtacggcgtg atcgacaccc 960
cttgctggaa gctgcacacc tccccctgt gcaccaccaa caccaaggag ggctccaaca 1020
tctgcctgac ccggaccgac cggggctggt actgcgacaa cgccggctcc gtgtccttct 1080
tccctctggc cgagacctgc aaggtgcagt ccaaccgggt gttctgcgac accatgaact 1140
ccctgaccct gccttccgag gtgaacctgt gcaacatcga catcttcaac cccaagtacg 1200
actgcaagat catgaccagc aagaccgacg tgctctccag 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 gaccctctgg 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
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic linker peptide

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Furin cleavage consensus motif

<400> 15
Arg Ala Arg Arg
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Furin cleavage consensus motif

<400> 16
Arg Lys Arg Arg
1

<210> 17
<211> 1542
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic PreF Polynucleotide

<400> 17
atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgaccctg 60
tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccgtg 120
tccaagggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag 180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag 240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc 300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctgggcg tgggctccgc catcgcttcc 360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc 420
ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc 480
aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag 540
tcctgtcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg 600
ctggagatca cccgcgagtt ctccgtgaac gccggcgatga ccaccctgt gtccacctac 660
atgctgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag 720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc 780

152

atcatcaagg aagaggtgct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac 840
accccttgct ggaagctgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggctcc 900
aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc tggtactgcg acaacgccgg ctccgtgtcc 960
ttcttccctc tggccgagac ctgcaaggtg cagtccaacc ggggtgttctg cgacaccatg 1020
aactccctga ccctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccccaag 1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cacctccctg 1140
ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga 1200
atcatcaaga ccttctccaa cggtgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg 1260
tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag 1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgaccct ctgggtgtcc cttccgacga gttcgacgcc 1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg ccttcatccg gaagtccgac 1440
gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc 1500
gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcggcgagg cc 1542

<210> 18
<211> 514
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic PreF Polypeptide

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
Página 21

153

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
115 120 125
His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
130 135 140
Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
145 150 155 160
Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
165 170 175
Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
180 185 190
Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
195 200 205
Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
210 215 220
Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
225 230 235 240
Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
245 250 255
Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
260 265 270
Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
275 280 285
Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
290 295 300
Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
305 310 315 320
Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
325 330 335
Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala

<210> 19
<211> 1542
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic PreF Polynucleotide

<400> 19
atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgaccctg 60
tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gagttctacc agtcacactg ctccgccgtg 120
tccaagggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag 180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag 240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtcacc 300

cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcaggcg tgggctccgc catcgctcc 360
 ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc 420
 ctgctgtcca ccaacaaggc cgtgggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc 480
 aagggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag 540
 tcctgtcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg 600
 ctggagatca cccgcgagtt ctccgtgaac gccggcgta ccaccctgt gtccacctac 660
 atgctgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag 720
 aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc 780
 atcatcaagg aagaggtgct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac 840
 accccttgtc ggaagctgca caccctcccc ctgtgacca ccaacaccaa ggagggctcc 900
 aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc tgggtactgcg acaacgccgg ctccgtgtcc 960
 ttcttcctc tggccgagac ctgcaaggtg cagtccaacc ggggtgttctg cgacaccatg 1020
 aactccctga ccctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccccaag 1080
 tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cacctccctg 1140
 ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga 1200
 atcatcaaga ccttctccaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg 1260
 tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag 1320
 ggcgagccta tcatcaactt ctacgacct ctggtgttcc cttccgacga gttcgacgcc 1380
 tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac cagtccctgg ccttcacccg gaagtccgac 1440
 gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc 1500
 gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcggcgagg cc 1542

<210> 20
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic PreF Polypeptide

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
Página 25

157

290

295

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> 21
<211> 1542
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

158

<220>

<223> Synthetic PreF Polynucleotide

<400> 21

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgaccctg	60
tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccgtg	120
tccaagggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc	300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcaggcg tggtctccgc catcgccctc	360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc	420
ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc	480
aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag	540
tcctgtcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg	600
ctggagatca cccgcgagtt ctccgtgaac gccggcgatga ccaccctgt gtccacctac	660
atgctgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag	720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc	780
atcatcaagg aagaggtgct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac	840
accccttgct ggaagctgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtcc	900
aacatctgcc tgaccggac cgaccggggc tggtagtgcg acaacgccgg ctccgtgtcc	960
ttcttcctc tggccgagac ctgcaaggtg cagtccaacc ggggtgtctg cgacaccatg	1020
aactccctga ccctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccccaag	1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cacctccctg	1140
ggcgccatcg tgctctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga	1200
atcatcaaga ctttctcaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg	1260
tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag	1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgacct ctggtgttcc ctccgacga gttcgacgcc	1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg cttcatccg gaagtccgac	1440
gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc	1500
gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcggcgagg cc	1542

<210> 22

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial sequence

159

<220>

<223> Synthetic PreF Polypeptide

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys

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

PATENT COOPERATION TREATY

CORRECTED VERSION

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2010/059008

International filing date (day/month/year)
24.06.2010

Priority date (day/month/year)
24.06.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/55 C07K14/135

Applicant
ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Heder, Andreas
Telephone No. +49 89 2399-7102



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2010/059008

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-59</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-59</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-59</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2010/059008

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1 MARTÍN D ET AL: "Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity." J GEN VIROL 2006 , VOL. 87, PAGE(S) 1649 - 1658
- D2 GONZÁLEZ-REYES L ET AL: "Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion." PNAS 2001 , VOL. 98, PAGE(S) 9859 - 9864
- D3 YIN HSIEN-SHENG ET AL: "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation." 5 January 2006 (2006-01-05) , NATURE 5 JAN 2006 , VOL. 439, PAGE(S) 38 - 44
- D7 VALARCHER J-F ET AL: "Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves." 2006, J GEN VIROL 87, PAGE(S) 1659 - 1667
- D9 WO 02/42326 A1

The present application relates to a variant fusion (F) protein (Pre_F) derived from respiratory syncytial virus (RSV) and its use as RSV vaccine.

- 1 **Claims 50-53** relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT**. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment. Patentability, in particular novelty and inventive step, of said claims has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the substance or composition.

- 2 A respiratory syncytial virus (RSV) F protein variant with the features recited in claim 1 is novel. Consequently, **all present claims are novel.**
- 3 The present claims do not involve an **inventive step**. **Claim 1** relates to an RSV F protein variant. RSV F protein variants are disclosed in the closest prior art, **D9** (see the claims, in particular claims 40, 44, and 59-62). The **difference** to claim 1 lies in the feature that the F protein is modified so as to alter glycosylation. The **objective technical problem** was thus: the provision of a further RSV F protein variant. The skilled man was motivated to solve the technical problem because RSV F protein was known to be useful as a candidate vaccine (see **D9**, claims). Improved F protein variants were of interest which required designing and testing alternatives.
- 4 Examples of F protein mutations were part of the general knowledge, see **D2**, **D3**, and **D7**. **D2** (see abstract, and p.9862) discloses mutations in both furin cleavage sites of RSV F protein. **D3** (see abstract, p.38, and Fig. 1) teaches the stabilization of the homologous parainfluenza virus 5 (SV5) F protein in its prefusion conformation by adding to the anchorless (C-terminal deleted, cf. **D1**) F protein an engineered, trimeric coiled-coil domain (GCNt). **D7** (see abstract, see Fig.1) relates to mutants of the homologous bovine RSV (BRSV) F protein. Here, mutation around the furin cleavage site at position 109, and delta p27 lacking amino acids 106-130 did not impede the protective immunity induced by recombinant BRSV carrying said mutation, but reduced the vaccine's adverse effect of pulmonary inflammation.
- 5 In view of the above, the subject-matter of claim 1 is one of many equally obvious alternative solutions of the technical problem. Moreover, a unexpected technical effect which the skilled man would not have foreseen in view of the prior art, is not seen. In particular, the unclear term "*modification that alters glycosylation*" does not relate to a technical feature which would cause a surprising effect.
- 6 For essentially the same reasons, **all present claims** lack an **inventive step**.

Re Item VI

Certain documents cited

Reference is made to the following document:

D8 WO 2009/079796 A1 (ID BIOMEDICAL CORP OF QUEBEC [CA];
GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BAU) 2 July 2009 (2009-07-02)

- 7 This document is from the same applicant and relates to the same features as the present application except for the feature of F protein modification which alters glycosylation (see claim 1).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 8 **Claim 1** makes reference to a result-to-be-achieved: "*the F protein polypeptide comprises at least one modification that alters glycosylation.*" The technical features underlying said result are missing from the claim which relates to a mere desideratum (Art. 6 PCT).
- 9 **Claim 5** does not specify what amino acid is changed or what it is changed into (Art. 6 PCT).
- 10 **Claim 57** relates to a desideratum for the same reason as claim 1 (see above), and furthermore because the nature of the alteration (i.e., increased glycosylation) which leads to increased expression is not recited (Art. 6 PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MD/VU62788-1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/059008	International filing date (day/month/year) 24/06/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 24/06/2009
Applicant ID BIOMEDICAL CORPORATION OF QUEBEC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/059008

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/155 C07K14/135
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTÍN DIANA ET AL: "Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity." June 2006 (2006-06), THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY JUN 2006 LNKD- PUBMED:16690930, VOL. 87, NR. PT 6, PAGE(S) 1649 - 1658 , XP002600413 ISSN: 0022-1317 abstract; introduction;; page 87; figure 1 ----- -/--	1-59

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2010

Date of mailing of the international search report

22/10/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONZÁLEZ-REYES L ET AL: "Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion." 14 August 2001 (2001-08-14), PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 14 AUG 2001 LNKD-PUBMED:11493675, VOL. 98, NR. 17, PAGE(S) 9859 - 9864 , XP002600414 ISSN: 0027-8424 abstract;; page 9862	1-59
Y	YIN HSIEN-SHENG ET AL: "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation." 5 January 2006 (2006-01-05), NATURE 5 JAN 2006 LNKD- PUBMED:16397490, VOL. 439, NR. 7072, PAGE(S) 38 - 44 , XP002600415 ISSN: 1476-4687 abstract, introduction; page 38; figure 1	1-59
Y	SCHMIDT A C ET AL: "Mucosal immunization of Rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD- DOI:10.1128/JVI.76.23.12355-12359.2002, vol. 76, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages, 1089-1099, XP002978183 ISSN: 0022-538X the whole document	1-59
A	HUANG YAN ET AL: "Modulation of protective immunity, eosinophilia, and cytokine responses by selective mutagenesis of a recombinant G protein vaccine against respiratory syncytial virus." April 2005 (2005-04), JOURNAL OF VIROLOGY APR 2005 LNKD- PUBMED:15767454, VOL. 79, NR. 7, PAGE(S) 4527 - 4532 , XP002600416 ISSN: 0022-538X the whole document	1-59

169

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANG RODERICK S ET AL: "Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys." October 2004 (2004-10), JOURNAL OF VIROLOGY OCT 2004 LNKD- PUBMED:15452239, VOL. 78, NR. 20, PAGE(S) 11198 - 11207 , XP002600417 ISSN: 0022-538X the whole document	1-59
Y	VALARCHER J-F ET AL: "Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves." June 2006 (2006-06), THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY JUN 2006 LNKD- PUBMED:16690931, VOL. 87, NR. PT 6, PAGE(S) 1659 - 1667 , XP002600418 ISSN: 0022-1317 abstract;figure 1	1-59
A,P	WO 2009/079796 A1 (ID BIOMEDICAL CORP OF QUEBEC [CA]; GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BAU) 2 July 2009 (2009-07-02) the whole document	1-59
Y	WO 02/42326 A1 (BIOTA SCIENT MANAGEMENT [AU]; MASON ANTHONY JOHN [AU]; TUCKER SIMON PE) 30 May 2002 (2002-05-30) claims 40,44, 59-62	1-59
A	VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S ET AL: "Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication" REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY, CHICHESTER, GB LNKD- DOI:10.1002/RMV.518, vol. 17, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 5-34, XP002510797 ISSN: 1052-9276 [retrieved on 2006-09-27] the whole document	1-59
	----- -/--	

120

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059008

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLSON MATTHEW R ET AL: "Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 7, no. 8, 1 October 2008 (2008-10-01) , pages 1239-1255, XP009138398 ISSN: 1476-0584 the whole document -----	1-59

171

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/059008

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009079796	A1	02-07-2009	AU 2008340949 A1	02-07-2009
			CA 2710600 A1	02-07-2009
			EP 2222710 A1	01-09-2010
WO 0242326	A1	30-05-2002	AU 2327502 A	03-06-2002
			US 2004161846 A1	19-08-2004



No. 11-181053-00000-0000

Fecha: 2011-12-29 16:46:07
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 172

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐