SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-018109- -00000-0000

Fecha. 2015-01-29 15:21:44 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-006115- -00010-0000

Fecha. 2015-01-29 15:21:44 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES DE PROTEINA F DE VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO (RSV) MODIFICADA

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61K 39/155

71. SOLICITANTE: NOVARTIS AG

DOMICILIO: BASEL, SUIZA

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-018109- -00000-0000

Fecha: 2015-01-29 15:21:44 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-006115- -00010-0000

Fecha: 2015-01-29 15:21:44 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 6

5

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

[ ] **Conversión** [X] **División** [ ] **Fusión**

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural [ ] Persona Jurídic [X]

NOVARTIS AG

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra [ ]

Documento de identificación: [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [ ] Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Suiza	Lichtstrasse 35, CH-4056,	Basel

[ ] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ — Apellidos y Nombre

C.C. 22.468.787 — Documento de identificación

147463 CSJ — Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

P-4844

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____	Expediente	Expediente_____
De: _____	12-006.115	De: _____
A: _____	De: _____	A: _____
	A: _____	

5. Comprobante de Pago No. **Fecha**

6. Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	
Nombre y apellidos	Firma
C.C. 22.468.787	Tarjeta Profesional T.P. 147463 CSJ

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

2

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capitulo I ☐ Capitulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)	
	Solicitud Internacional No. PCT/US2010/042161	Fecha 15 de Julio de 2010
	Publicación Internacional No. WO 2011/008974	Fecha 20 de Enero de 2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)	
	COMPOSICIONES DE PROTEINA F DE VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO (RSV) MODIFICADA	
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)A61K 39/155	
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria	

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
NOVARTIS AG			

6	DATOS DEL SOLICITANTE	
	DIRECCIÓN: **Lichtstrasse 35, CH-4056,**	No. TELÉFONO:
	CIUDAD: **Basel**	CORREO ELECTRONICO:
	PAÍS DE RESIDENCIA:**Suiza**	LUGAR DE CONSTITUCIÓN: **Suiza**

7	INVENTOR (ES)		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. SWANSON, 2. DORMITZER,	Kurt Philip, R	
	DIRECCIÓN DE CORREOELECTRÓNICO:		

8	DATOS INVENTOR (ES)		
	DIRECCIÓN	CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
	1. c/o Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. IP Services M/S X-100B PO Box 8097,	Emeryville, CA 94662-8097,	Estados Unidos de América.
	2. c/o Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc. IP Services M/S X-100B PO Box 8097,	Emeryville, CA 94662-8097,	Estados Unidos de América.

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9	☐REPRESENTANTE LEGAL ☒APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	LÓPEZ DÍAZ	**SILVANA MARIA**	**C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ**

DIRECCIÓN	Cra. 11 No. 86 – 53 Piso 6	No. TELÉFONO	6181088
CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	notificaciones@clarkemodet.com.co
PAÍS	Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD
	1.Estados Unidos de América	US	61/225,805	2009/07/15
	2.Estados Unidos de America	US	61/294,426	2010/01/12

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los paises miembros de la Comunidad Andina es pais de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de paises miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	☐
Universidades públicas o privadas	☐
Entidades sin ánimo de lucro	☐

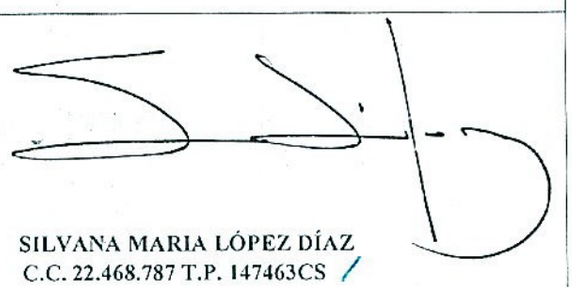
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leido y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en linea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°15-008853 15-0011157	Fecha 22/01/2015 29/01/2015

16	FIRMA DEL APODERADO :



SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 T.P. 147463CS

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 313
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 16
3. ☐ Dibujos y/o figuras — N° folios:
4. ☒ Resumen
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso. Y **Sustitución**
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Declaraciones** 4.17
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.

☐ Hoja de información complementaria

☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

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

3

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 008853

Bogotá D.C., Enero 22 de 2015 - 16:30:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	210405215	22/01/2015	37.103.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

==========

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-006115- -00010-0000

Fecha. 2015-01-29 15:21:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-018109- -00000-0000

Fecha. 2015-01-29 15:21:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0011157

Bogotá D.C., Enero 29 de 2015 - 10:41:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	170	05/01/2015		202.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
6	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	192.000.00
				$192.000.00

SON: **CIENTO NOVENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-006115- -00010-0000

Fecha: 2015-01-29 15:21:44 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-018109- -00000-0000

Fecha: 2015-01-29 15:21:44 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 6

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: 5

Dependencia Jerárquica: Del. Propiedad Industrial	Código: 2000
Dependencia Productora : 6. Nuevas Creaciones	Código: 2020
Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: □ Traslado: □ Convenio: □	
Radicador:	

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 15-18109-0 12-6115-10	Solicitante / ***Quejoso / Demandante / otros.***
Prueba excluida: cd	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO

N°. de bloque:		Otras especificaciones:
N°. de rodante:		
N°. de estante:		
N°. de archivador:		
N°. de entrepaño:		
N°. de gaveta:		
N°. de caja:		

IMPORTANTE:

- El material gráfico ***o especial*** que se encuentra ***dentro o anexo a*** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones:

El cd contiene:
2 archivos en formato pdf, procesados y subidos al sistema.

Unidad de Conservación

- ○ Bolsa
- ○ Caja
- ○ Libro
- ○ Sobre
- ○ Tomo
- ○ Otro

Soporte Documental

- ● CD
- ○ Disquete
- ○ DVD
- ○ Folleto
- ○ Periódico
- ○ Plano
- ○ Publicación Periódica
- ○ USB
- ○ Otro

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 15-018109- -00000-0000

Fecha: 2015-01-29 15:21:44 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 6

S

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-006115- -00010-0000

Fecha: 2015-01-29 15:21:44 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 6

- ☐ Indicación que se solicita una patente
- ☐ Datos de identificación del solicitante
- ☐ 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 INVENCIÓN 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 ☐

SEQUENCE LISTING

<110> SWANSON, KURT
DORMITZER, PHILIP R.

<120> RSV F PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING SAME

<130> PAT053705-US-PCT

<140> 13/383,897
<141> 2012-01-13

<150> PCT/US2010/042161
<151> 2010-07-15

<150> 61/294,426
<151> 2010-01-12

<150> 61/225,805
<151> 2009-07-15

<160> 112

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 1

```
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 Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu 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 Ile Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380
```

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

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

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

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met 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 Thr 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> 2
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 2

```
Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1               5                   10                  15

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

```
Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe 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 Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr 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 Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
            100                 105                 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
        115                 120                 125

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

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn 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 Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

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

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

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

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

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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 Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
    370                 375                 380

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

Asp Ile 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 Leu Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

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

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

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


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


<210> 3
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 3
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Lys Glu Leu Pro Arg Phe Met
1               5                   10                  15


Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
            20                  25                  30


Lys Arg Lys Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
        35                  40                  45


Ile Ala Ser
    50


<210> 4
<211> 48
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 4
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Glu Leu Pro Arg Phe Met
1               5                   10                  15


Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
            20                  25                  30


Lys Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
        35                  40                  45


<210> 5
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 5
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Gln Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 6
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 6
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Arg Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 7
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln Asn Gln Asn
1 5 10 15

Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
20 25 30

<210> 8
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu
1 5 10 15

Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
20 25

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 9
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Gln Gln Arg Phe Leu
1 5 10 15

Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
20 25

<210> 10
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 10
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Gln Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 11
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Gln Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 12
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 12
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser
35 40

<210> 13
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 13
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Ile Glu Gly Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
20 25 30

Lys Ile Glu Gly Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 14
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 14
Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
35 40 45

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
50 55 60

<210> 15
<211> 60
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 15
Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Val Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe
35 40 45

Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys
50 55 60

<210> 16
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 16
Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Ile Asn
35

<210> 17
<211> 67
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 17
Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Val Asn Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg
35 40 45

Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser
50 55 60

Thr Phe Leu
65

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 18

Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Val Asn Asn Lys Asn Asp Asp Lys Gly Ser Gly Tyr
35 40 45

Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly
50 55 60

Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
65 70

<210> 19
<211> 29
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Description of Unknown: Bacteriophage T4 fibritin sequence

<400> 19
Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val
1 5 10 15

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
20 25

<210> 20
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 20
Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His
1 5 10 15

Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala
20 25 30

<210> 21
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 21
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr

```
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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> 22
<211> 1727
<212> DNA
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 22
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560

agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620

ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc 1680

aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca actgaag 1727

<210> 23
<211> 588
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
```

385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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 Ser Gly
565 570 575

Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
580 585

<210> 24
<211> 1769
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 24
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560

agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620

ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc 1680

aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca acagcggcgg cagcgccggc 1740

tctggccacc accaccatca ccactgaag 1769

<210> 25
<211> 624
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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 Gly Ser
565 570 575

Ser Gly Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
580 585 590

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
595 600 605

Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
610 615 620

<210> 26
<211> 1877
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 26
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560

agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620

ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc 1680

aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca acggcagcag cggccggatg 1740

aagcagatcg aggacaagat cgaggaaatc ctgagcaaga tctaccacat cgagaacgag 1800

atcgcccgga tcaagaagct gatcggcgaa agcggcggct ctgccggaag cggccaccac 1860

caccatcacc actgaag 1877

<210> 27
<211> 626
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 27
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe

```
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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 Gly Ser
565 570 575

Ser Gly Ser Gly Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile
580 585 590

Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys
595 600 605

Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His
610 615 620

His His
625

<210> 28
<211> 1883
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 28
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560

agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620

ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc 1680

aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca acggcagcag cggcagcggc 1740

cggatgaagc agatcgagga caagatcgag gaaatcctga gcaagatcta ccacatcgag 1800

aacgagatcg cccggatcaa gaagctgatc ggcgaaagcg gcggctctgc cggaagcggc 1860

caccaccacc atcaccactg aag 1883

<210> 29
<211> 531
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His
        515                 520                 525

His His His
    530
```

<210> 30
<211> 1598

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 30
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tagcggcggc 1560

agcgccggct ctggccacca ccaccatcac cactgaag 1598

<210> 31
<211> 557
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
```

210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
515 520 525

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
530 535 540

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
545 550 555

<210> 32
<211> 1676
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 32
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgacaagatc 1560

gaggaaatcc tgagcaagat ctaccacatc gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg 1620

atcggcgaaa gcggcggctc tgccggaagc ggccaccacc accatcacca ctgaag 1676

<210> 33
<211> 615
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 33
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro

```
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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 Gly Ser
                565                 570                 575

Ser Gly Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val
            580                 585                 590

Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser
        595                 600                 605
```

Gly His His His His His His
610 615

<210> 34
<211> 1850
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 34
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560

agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620

ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc 1680

aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca acggcagcag cggcaatgag 1740

aagttccacc agatcgagaa agaattcagc gaggtggagg gccggatcca ggacctggaa 1800

aagagcggcg gctctgccgg aagcggccac caccaccatc accactgaag 1850

<210> 35
<211> 553
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 35

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr
1				5				10					15		
Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
	50					55					60				
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70					75					80
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu
				85					90					95	
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Asn	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Pro
			100					105					110		
Arg	Phe	Met	Asn	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Ala	Lys	Lys	Thr	Asn	Val	Thr
		115					120					125			
Leu	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val
	130					135					140				
Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu
145					150					155					160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
```

405 410 415

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
515 520 525

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Ser Gly Gly Ser Ala
530 535 540

Gly Ser Gly His His His His His His
545 550

<210> 36
<211> 1664
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 36
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtcctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgagaagttc 1560

caccagatcg agaaagaatt cagcgaggtg gagggccgga tccaggacct ggaaaagagc 1620

ggcggctctg ccggaagcgg ccaccaccac catcaccact gaag 1664

<210> 37
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 37
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
```

290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile
465 470 475 480

Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu
485 490 495

Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp
500 505 510

Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn Met Gly Gly Ser
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 38
<211> 1607
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 38
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca atatcatgat caccacaatc 1440

atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc 1500

aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc 1560

gccttctcca acatgggggg ttctcatcat catcatcatc attgaag 1607

<210> 39
<211> 524
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn
515 520

<210> 40
<211> 1577
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 40
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240

caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360

aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480

gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660

atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780

atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccccctgct ggaagctgca caccagcccc 960

ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc 1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080

cagagcaacc gggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200

gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380

aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560

agcaccacca attgaag 1577

<210> 41
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 41

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr
1				5				10					15		
Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
	50					55					60				
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70					75					80
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu
				85					90					95	
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Asn	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Pro
			100					105					110		
Arg	Phe	Met	Asn	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Ala	Lys	Lys	Thr	Asn	Val	Thr
		115					120					125			
Leu	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val
	130					135					140				
Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu

```
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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> 42
<211> 590
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 42
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

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

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ile Met Ile Thr
    530                 535                 540
```

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
545 550 555 560

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
565 570 575

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
580 585 590

<210> 43
<211> 588
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 43
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Met Ile Thr Thr Ile
530 535 540

Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu
545 550 555 560

Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp
565 570 575

Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
580 585

<210> 44
<211> 588
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 44
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ile Glu Gly Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Met Ile Thr Thr Ile
    530                 535                 540
```

```
Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu
545                 550                 555                 560


Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp
                565                 570                 575


Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
            580                 585


<210> 45
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 45
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
            100                 105                 110


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


Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 46
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 46
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly His His His His His His
    530                 535


<210> 47
<211> 516
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide
```

<400> 47

```
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 Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
            100                 105                 110

Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
        115                 120                 125

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

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

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
                165                 170                 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
            180                 185                 190

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

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr
    210                 215                 220

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

Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn
                245                 250                 255
```

```
Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys
            260                 265                 270

Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile
        275                 280                 285

Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn
    290                 295                 300

Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp
305                 310                 315                 320

Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr
                325                 330                 335

Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro
        355                 360                 365

Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser
    370                 375                 380

Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys
385                 390                 395                 400

Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn
                405                 410                 415

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

Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val
        435                 440                 445

Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser
    450                 455                 460

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

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

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His
```

500 505 510

His His His His
515

<210> 48
<211> 514
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 48
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 Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
100 105 110

Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
115 120 125

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

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

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
165 170 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
180 185 190

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

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
    210                 215                 220

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

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
                245                 250                 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
            260                 265                 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
        275                 280                 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
    290                 295                 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
                325                 330                 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
        355                 360                 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
    370                 375                 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
                405                 410                 415

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

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
```

435 440 445

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

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

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His
500 505 510

His His

<210> 49
<211> 514
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 49
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 Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
115 120 125

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

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

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
                165                 170                 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
            180                 185                 190

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

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
    210                 215                 220

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

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
                245                 250                 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
            260                 265                 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
        275                 280                 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
    290                 295                 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
                325                 330                 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
        355                 360                 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
```

370 375 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385 390 395 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
405 410 415

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

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

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

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

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His
500 505 510

His His

<210> 50
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 50
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 Lys Glu Leu Pro
            100                 105                 110

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

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Lys Lys 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
```

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 51
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 51

```
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 Gln Glu Leu Pro
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val
```

225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala
340 345 350

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

Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe
370 375 380

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

Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys
405 410 415

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

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

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

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

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

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

Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 52
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 52
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 Ile Glu Gly Arg Glu Leu Pro
100 105 110

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

Leu Ser Lys Lys Ile Glu Gly 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 53
<211> 566
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 53
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

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

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

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

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly
    530                 535                 540

Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
545                 550                 555                 560

His His His His His His
                565
```

<210> 54
<211> 572
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala
    530                 535                 540

Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly
545                 550                 555                 560

Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
                565                 570
```

<210> 55
<211> 557
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
        515                 520                 525

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
    530                 535                 540

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
545                 550                 555


<210> 56
<211> 553
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 56
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
515 520 525

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Ser Gly Gly Ser Ala
530 535 540

Gly Ser Gly His His His His His His
545 550

<210> 57
<211> 557
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 57
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
        515                 520                 525

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
    530                 535                 540

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
545                 550                 555


<210> 58
<211> 536
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 58
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 Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
            100                 105                 110

Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
        115                 120                 125

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

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

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
                165                 170                 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
            180                 185                 190

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

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr
    210                 215                 220

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

Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn
                245                 250                 255

Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys
            260                 265                 270

Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile
        275                 280                 285

Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn
    290                 295                 300

Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp
305                 310                 315                 320
```

```
Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr
                325                 330                 335

Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro
        355                 360                 365

Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser
    370                 375                 380

Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys
385                 390                 395                 400

Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn
                405                 410                 415

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

Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val
        435                 440                 445

Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser
    450                 455                 460

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

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

Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu
            500                 505                 510

Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly
        515                 520                 525

Ser Gly His His His His His His
    530                 535
```

<210> 59
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 59

```
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 Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
            100                 105                 110

Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
        115                 120                 125

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

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

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
                165                 170                 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
            180                 185                 190

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

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
    210                 215                 220

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

```
Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
                245                 250                 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
            260                 265                 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
        275                 280                 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
    290                 295                 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
                325                 330                 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
        355                 360                 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
    370                 375                 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
                405                 410                 415

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

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

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

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

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys
```

485 490 495

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

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 60
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 60
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 Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
115 120 125

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

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

```
Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
                165                 170                 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
            180                 185                 190

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

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
    210                 215                 220

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

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
                245                 250                 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
            260                 265                 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
        275                 280                 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
    290                 295                 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
                325                 330                 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
        355                 360                 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
    370                 375                 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
```

405 410 415

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 61
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 61
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
```

325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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> 62
<211> 553
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 62

```
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 Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
            100                 105                 110

Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
        115                 120                 125

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

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

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
                165                 170                 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
            180                 185                 190

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

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr
```

210 215 220

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

Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn
245 250 255

Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys
260 265 270

Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile
275 280 285

Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn
290 295 300

Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp
305 310 315 320

Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr
325 330 335

Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu
340 345 350

Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro
355 360 365

Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser
370 375 380

Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys
385 390 395 400

Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn
405 410 415

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

Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val
435 440 445

Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser
450 455 460

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

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

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val
500 505 510

Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr
515 520 525

Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser
530 535 540

Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
545 550

<210> 63
<211> 551
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 63
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 Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
100 105 110

Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly

115 120 125

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

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

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
165 170 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
180 185 190

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

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
210 215 220

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

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
245 250 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
260 265 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
275 280 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
290 295 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305 310 315 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
325 330 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
340 345 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
355 360 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
370 375 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385 390 395 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
405 410 415

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

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

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

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

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile
500 505 510

Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys
515 520 525

Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile
530 535 540

Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
545 550

<210> 64
<211> 551
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 64
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 Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
115 120 125

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

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

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
165 170 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
180 185 190

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

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
210 215 220

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

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
245 250 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
260 265 270

```
Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
        275                 280                 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
    290                 295                 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
                325                 330                 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
        355                 360                 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
    370                 375                 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
                405                 410                 415

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

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

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

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

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
                485                 490                 495

Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile
            500                 505                 510

Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys
        515                 520                 525
```

Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile
530 535 540

Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
545 550

<210> 65
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 65
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 66
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 66
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

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350
```

```
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
            420                 425                 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
        435                 440                 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465                 470                 475                 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
                485                 490                 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
        515                 520                 525

Gly Ser Gly His His His His His His
    530                 535


<210> 67
<211> 528
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 67
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1               5                   10                  15
```

```
Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
            20                  25                  30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
        35                  40                  45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
    50                  55                  60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65                  70                  75                  80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
                85                  90                  95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala
    130                 135                 140

Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser
145                 150                 155                 160

Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val
                165                 170                 175

Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys
            180                 185                 190

Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile
        195                 200                 205

Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile
    210                 215                 220

Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr
225                 230                 235                 240

Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro
                245                 250                 255

Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val
            260                 265                 270
```

```
Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu
        275                 280                 285

Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys
    290                 295                 300

Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn
                325                 330                 335

Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln
            340                 345                 350

Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser
        355                 360                 365

Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys
    370                 375                 380

Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser
385                 390                 395                 400

Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser
                405                 410                 415

Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr
            420                 425                 430

Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr
        435                 440                 445

Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro
    450                 455                 460

Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp
465                 470                 475                 480

Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe
                485                 490                 495

Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser
            500                 505                 510

Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
        515                 520                 525
```

<210> 68
<211> 531
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 68

```
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1               5                  10                  15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
            20                  25                  30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
        35                  40                  45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
    50                  55                  60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65                  70                  75                  80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
                85                  90                  95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys
145                 150                 155                 160

Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr
            180                 185                 190

Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile
        195                 200                 205
```

```
Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu
    210                 215                 220

Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro
225                 230                 235                 240

Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn
                245                 250                 255

Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val
            260                 265                 270

Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu
        275                 280                 285

Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp
    290                 295                 300

Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr
305                 310                 315                 320

Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr
                325                 330                 335

Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys
            340                 345                 350

Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys
    370                 375                 380

Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val
385                 390                 395                 400

Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys
                405                 410                 415

Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly
            420                 425                 430

Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn
        435                 440                 445

Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys
    450                 455                 460
```

Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp
465 470 475 480

Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser
485 490 495

Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala
500 505 510

Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His
515 520 525

His His His
530

<210> 69
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 69
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
115 120 125

```
Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380
```

```
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
            420                 425                 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
        435                 440                 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465                 470                 475                 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
                485                 490                 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
        515                 520                 525

Gly Ser Gly His His His His His His
    530                 535
```

<210> 70
<211> 524
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 70

```
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300
```

```
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
            420                 425                 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
        435                 440                 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465                 470                 475                 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
                485                 490                 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn
        515                 520
```

<210> 71
<211> 501
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 71

```
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 Gln Gln Gln Gln
            100                 105                 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
        115                 120                 125

Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile
    130                 135                 140

Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn
145                 150                 155                 160

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
                165                 170                 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
            180                 185                 190

Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu
        195                 200                 205

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
    210                 215                 220

Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp
225                 230                 235                 240
```

```
Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
               245                 250                 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
            260                 265                 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
        275                 280                 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
    290                 295                 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
               325                 330                 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
        355                 360                 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
    370                 375                 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
               405                 410                 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
            420                 425                 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
        435                 440                 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
    450                 455                 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
465                 470                 475                 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
```

485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn
500

<210> 72
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 72
ttggatctgc aatcgcca 18

<210> 73
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 73
cttttgatct tgttcacttc tccttct 27

<210> 74
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic probe

<400> 74
tggcactgct gtatctaagg tcctgcact 29

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 75
Leu Val Pro Arg
1

<210> 76
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 76
Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 77
Arg Ala Arg Lys
1

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 78
Arg Ala Arg Gln
1

<210> 79
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 79
Gln Ala Gln Asn
1

<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 80

Ile Glu Gly Arg
1

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 81
Arg Lys Lys Lys
1

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 82
Gln Asn Gln Asn
1

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 83
Gln Gln Gln Arg
1

<210> 84
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 84
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

```
Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
        35                  40                  45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
    50                  55                  60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65                  70                  75                  80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
                85                  90                  95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
    130                 135                 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
                165                 170                 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285
```

```
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
            420                 425                 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
        435                 440                 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465                 470                 475                 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
                485                 490                 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
        515                 520                 525

Gly Ser Gly His His His His His His
```

530 535

<210> 85
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 85

```
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

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
            420                 425                 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
        435                 440                 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
```

450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 86
<211> 516
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 86
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 Gln Gln Asn Gln
100 105 110

Gln Gln Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
115 120 125

```
Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn
    130                 135                 140

Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
                165                 170                 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
            180                 185                 190

Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg
        195                 200                 205

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr
    210                 215                 220

Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile
225                 230                 235                 240

Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn
                245                 250                 255

Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys
            260                 265                 270

Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile
        275                 280                 285

Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn
    290                 295                 300

Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp
305                 310                 315                 320

Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr
                325                 330                 335

Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro
        355                 360                 365

Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser
```

370 375 380

Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys
385 390 395 400

Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn
405 410 415

Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly
420 425 430

Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val
435 440 445

Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser
450 455 460

Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln
465 470 475 480

Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn
485 490 495

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His
500 505 510

His His His His
515

<210> 87
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 87
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
    130                 135                 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
                165                 170                 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
```

305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 88
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 88

```
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Gln
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
```

225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 89
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 89
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400
```

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 90
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 90
Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
1 5 10

<210> 91
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 91
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
35 40 45

<210> 92
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 92
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Gln Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 93
<211> 537
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 93
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 Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn 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 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
```

325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 94
<211> 37
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 94
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His His Val Asn Ala Gly
20 25 30

Lys Ser Thr Thr Asn
35

<210> 95
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 95
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Ile
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu Leu His His Ile Asn Ala Gly
20 25 30

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Gly
35 40 45

Ser Gly Ser Gly
50

<210> 96
<211> 71
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 96
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys
20 25 30

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
35 40 45

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Gly Ser Gly Ser Gly Asp Asp Asp
50 55 60

Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly

65 70

<210> 97
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 97
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu Leu His His Ile Asn Ala Gly
20 25 30

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ile Glu Gly Arg Gly Ser
35 40 45

Gly Ser Gly
50

<210> 98
<211> 70
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 98
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His His Val Asn Asp Lys
20 25 30

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
35 40 45

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ile Glu Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Ser Gly
65 70

<210> 99
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 99
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu Leu His Asn Ile Asn Ala Gly
20 25 30

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
35 40 45

Gly Ser Gly
50

<210> 100
<211> 70
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 100
Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys
20 25 30

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
35 40 45

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Gly Ser Gly Ser Gly Leu Val Pro
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Ser Gly
65 70

<210> 101
<211> 12463
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 101
ataggcggcg catgagagaa gcccagacca ttacctacc caaaatggag aaagttcacg 60

ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120

aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180

tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240

gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300

gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360

aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc 420

ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc 480

aagtcgctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc gacaagtctc tatcaccaag 540

ccaataaggg agttagagtc gcctactgga taggctttga caccacccct tttatgttta 600

agaacttggc tggagcatat ccatcatact ctaccaactg ggccgacgaa accgtgttaa 660

cggctcgtaa cataggccta tgcagctctg acgttatgga gcggtcacgt agagggatgt 720

ccattcttag aaagaagtat ttgaaaccat ccaacaatgt tctattctct gttggctcga 780

ccatctacca cgagaagagg gacttactga ggagctggca cctgccgtct gtatttcact 840

tacgtggcaa gcaaaattac acatgtcggt gtgagactat agttagttgc gacgggtacg 900

tcgttaaaag aatagctatc agtccaggcc tgtatgggaa gccttcaggc tatgctgcta 960

cgatgcaccg cgagggattc ttgtgctgca aagtgacaga cacattgaac ggggagaggg 1020

tctcttttcc cgtgtgcacg tatgtgccag ctacattgtg tgaccaaatg actggcatac 1080

tggcaacaga tgtcagtgcg gacgacgcgc aaaaactgct ggttgggctc aaccagcgta 1140

tagtcgtcaa cggtcgcacc cagagaaaca ccaataccat gaaaaattac cttttgcccg 1200

tagtggccca ggcatttgct aggtgggcaa aggaatataa ggaagatcaa gaagatgaaa 1260

ggccactagg actacgagat agacagttag tcatggggtg ttgttgggct tttagaaggc 1320

acaagataac atctatttat aagcgcccgg atacccaaac catcatcaaa gtgaacagcg 1380

atttccactc attcgtgctg cccaggatag gcagtaacac attggagatc gggctgagaa 1440

caagaatcag gaaaatgtta gaggagcaca aggagccgtc acctctcatt accgccgagg 1500

acgtacaaga agctaagtgc gcagccgatg aggctaagga ggtgcgtgaa gccgaggagt 1560

tgcgcgcagc tctaccacct ttggcagctg atgttgagga gcccactctg gaagccgatg 1620

tagacttgat gttacaagag gctggggccg gctcagtgga gacacctcgt ggcttgataa 1680

aggttaccag ctacgatggc gaggacaaga tcggctctta cgctgtgctt tctccgcagg 1740

ctgtactcaa gagtgaaaaa ttatcttgca tccaccctct cgctgaacaa gtcatagtga 1800

taacacactc tggccgaaaa gggcgttatg ccgtggaacc ataccatggt aaagtagtgg 1860

tgccagaggg acatgcaata cccgtccagg actttcaagc tctgagtgaa agtgccacca 1920

ttgtgtacaa cgaacgtgag ttcgtaaaca ggtacctgca ccatattgcc acacatggag 1980

gagcgctgaa cactgatgaa gaatattaca aaactgtcaa gcccagcgag cacgacggcg 2040

aatacctgta cgacatcgac aggaaacagt gcgtcaagaa agaactagtc actgggctag 2100

ggctcacagg cgagctggtg gatcctccct tccatgaatt cgcctacgag agtctgagaa 2160

cacgaccagc cgctccttac caagtaccaa ccataggggt gtatggcgtg ccaggatcag 2220

gcaagtctgg catcattaaa agcgcagtca ccaaaaaaga tctagtggtg agcgccaaga 2280

aagaaaactg tgcagaaatt ataagggacg tcaagaaaat gaaagggctg gacgtcaatg 2340

ccagaactgt ggactcagtg ctcttgaatg gatgcaaaca ccccgtagag accctgtata 2400

ttgacgaagc ttttgcttgt catgcaggta ctctcagagc gctcatagcc attataagac 2460

ctaaaaaggc agtgctctgc ggggatccca aacagtgcgg ttttttaac atgatgtgcc 2520

tgaaagtgca ttttaaccac gagatttgca cacaagtctt ccacaaaagc atctctcgcc 2580

gttgcactaa atctgtgact tcggtcgtct caaccttgtt ttacgacaaa aaaatgagaa 2640

cgacgaatcc gaaagagact aagattgtga ttgacactac cggcagtacc aaacctaagc 2700

aggacgatct cattctcact tgtttcagag ggtgggtgaa gcagttgcaa atagattaca 2760

aaggcaacga aataatgacg gcagctgcct ctcaagggct gacccgtaaa ggtgtgtatg 2820

ccgttcggta caaggtgaat gaaaatcctc tgtacgcacc cacctcagaa catgtgaacg 2880

tcctactgac ccgcacggag gaccgcatcg tgtggaaaac actagccggc gacccatgga 2940

taaaaacact gactgccaag taccctggga atttcactgc cacgatagag gagtggcaag 3000

cagagcatga tgccatcatg aggcacatct tggagagacc ggaccctacc gacgtcttcc 3060

agaataaggc aaacgtgtgt tgggccaagg ctttagtgcc ggtgctgaag accgctggca 3120

tagacatgac cactgaacaa tggaacactg tggattattt tgaaacggac aaagctcact 3180

cagcagagat agtattgaac caactatgcg tgaggttctt tggactcgat ctggactccg 3240

gtctattttc tgcacccact gttccgttat ccattaggaa taatcactgg gataactccc 3300

cgtcgcctaa catgtacggg ctgaataaag aagtggtccg tcagctctct cgcaggtacc 3360

cacaactgcc tcgggcagtt gccactggaa gagtctatga catgaacact ggtacactgc 3420

gcaattatga tccgcgcata aacctagtac ctgtaaacag aagactgcct catgctttag 3480

tcctccacca taatgaacac ccacagagtg acttttcttc attcgtcagc aaattgaagg 3540

gcagaactgt cctggtggtc ggggaaaagt tgtccgtccc aggcaaaatg gttgactggt 3600

tgtcagaccg gcctgaggct accttcagag ctcggctgga tttaggcatc ccaggtgatg 3660

tgcccaaata tgacataata tttgttaatg tgaggacccc atataaatac catcactatc 3720

agcagtgtga agaccatgcc attaagctta gcatgttgac caagaaagct tgtctgcatc 3780

tgaatcccgg cggaacctgt gtcagcatag gttatggtta cgctgacagg gccagcgaaa 3840

gcatcattgg tgctatagcg cggcagttca agttttcccg ggtatgcaaa ccgaaatcct 3900

cacttgaaga gacggaagtt ctgtttgtat tcattgggta cgatcgcaag gcccgtacgc 3960

acaatcctta caagctttca tcaaccttga ccaacattta tacaggttcc agactccacg 4020

aagccggatg tgcaccctca tatcatgtgg tgcgagggga tattgccacg gccaccgaag 4080

gagtgattat aaatgctgct aacagcaaag gacaacctgg cggaggggtg tgcggagcgc 4140

tgtataagaa attcccggaa agcttcgatt tacagccgat cgaagtagga aaagcgcgac 4200

tggtcaaagg tgcagctaaa catatcattc atgccgtagg accaaacttc aacaaagttt 4260

cggaggttga aggtgacaaa cagttggcag aggcttatga gtccatcgct aagattgtca 4320

acgataacaa ttacaagtca gtagcgattc cactgttgtc caccggcatc ttttccggga 4380

acaaagatcg actaacccaa tcattgaacc atttgctgac agctttagac accactgatg 4440

cagatgtagc catatactgc agggacaaga aatgggaaat gactctcaag gaagcagtgg 4500

ctaggagaga agcagtggag gagatatgca tatccgacga ctcttcagtg acagaacctg 4560

atgcagagct ggtgagggtg catccgaaga gttctttggc tggaaggaag ggctacagca 4620

caagcgatgg caaaactttc tcatatttgg aagggaccaa gtttcaccag gcggccaagg 4680

atatagcaga aattaatgcc atgtggcccg ttgcaacgga ggccaatgag caggtatgca 4740

tgtatatcct cggagaaagc atgagcagta ttaggtcgaa atgccccgtc gaagagtcgg 4800

aagcctccac accacctagc acgctgcctt gcttgtgcat ccatgccatg actccagaaa 4860

gagtacagcg cctaaaagcc tcacgtccag aacaaattac tgtgtgctca tcctttccat 4920

tgccgaagta tagaatcact ggtgtgcaga agatccaatg ctcccagcct atattgttct 4980

caccgaaagt gcctgcgtat attcatccaa ggaagtatct cgtggaaaca ccaccggtag 5040

acgagactcc ggagccatcg gcagagaacc aatccacaga ggggacacct gaacaaccac 5100

cacttataac cgaggatgag accaggacta gaacgcctga gccgatcatc atcgaagagg 5160

aagaagagga tagcataagt ttgctgtcag atggcccgac ccaccaggtg ctgcaagtcg 5220

aggcagacat tcacgggccg ccctctgtat ctagctcatc ctggtccatt cctcatgcat 5280

ccgactttga tgtggacagt ttatccatac ttgacaccct ggagggagct agcgtgacca 5340

gcggggcaac gtcagccgag actaactctt acttcgcaaa gagtatggag tttctggcgc 5400

gaccggtgcc tgcgcctcga acagtattca ggaaccctcc acatcccgct ccgcgcacaa 5460

gaacaccgtc acttgcaccc agcagggcct gctcgagaac cagcctagtt tccaccccgc 5520

caggcgtgaa tagggtgatc actagagagg agctcgaggc gcttaccccg tcacgcactc 5580

ctagcaggtc ggtctcgaga accagcctgg tctccaaccc gccaggcgta aatagggtga 5640

ttacaagaga ggagtttgag gcgttcgtag cacaacaaca atgacggttt gatgcgggtg 5700

catacatctt ttcctccgac accggtcaag ggcatttaca acaaaaatca gtaaggcaaa 5760

cggtgctatc cgaagtggtg ttggagagga ccgaattgga gatttcgtat gccccgcgcc 5820

tcgaccaaga aaaagaagaa ttactacgca agaaattaca gttaaatccc acacctgcta 5880

acagaagcag ataccagtcc aggaaggtgg agaacatgaa agccataaca gctagacgta 5940

ttctgcaagg cctagggcat tatttgaagg cagaaggaaa agtggagtgc taccgaaccc 6000

tgcatcctgt tcctttgtat tcatctagtg tgaaccgtgc cttttcaagc cccaaggtcg 6060

cagtggaagc ctgtaacgcc atgttgaaag agaactttcc gactgtggct tcttactgta 6120

ttattccaga gtacgatgcc tatttggaca tggttgacgg agcttcatgc tgcttagaca 6180

ctgccagttt ttgccctgca aagctgcgca gctttccaaa gaaacactcc tatttggaac 6240

ccacaatacg atcggcagtg ccttcagcga tccagaacac gctccagaac gtcctggcag 6300

ctgccacaaa aagaaattgc aatgtcacgc aaatgagaga attgcccgta ttggattcgg 6360

cggcctttaa tgtggaatgc ttcaagaaat atgcgtgtaa taatgaatat tgggaaacgt 6420

ttaaagaaaa ccccatcagg cttactgaag aaaacgtggt aaattacatt accaaattaa 6480

aaggaccaaa agctgctgct ctttttgcga agacacataa tttgaatatg ttgcaggaca 6540

taccaatgga caggtttgta atggacttaa agagagacgt gaaagtgact ccaggaacaa 6600

aacatactga agaacggccc aaggtacagg tgatccaggc tgccgatccg ctagcaacag 6660

cgtatctgtg cggaatccac cgagagctgg ttaggagatt aaatgcggtc ctgcttccga 6720

acattcatac actgtttgat atgtcggctg aagactttga cgctattata gccgagcact 6780

tccagcctgg ggattgtgtt ctggaaactg acatcgcgtc gtttgataaa agtgaggacg 6840

acgccatggc tctgaccgcg ttaatgattc tggaagactt aggtgtggac gcagagctgt 6900

tgacgctgat tgaggcggct ttcggcgaaa tttcatcaat acatttgccc actaaaacta 6960

aatttaaatt cggagccatg atgaaatctg gaatgttcct cacactgttt gtgaacacag 7020

tcattaacat tgtaatcgca agcagagtgt tgagagaacg gctaaccgga tcaccatgtg 7080

cagcattcat tggagatgac aatatcgtga aaggagtcaa atcggacaaa ttaatggcag 7140

acaggtgcgc cacctggttg aatatggaag tcaagattat agatgctgtg gtgggcgaga 7200

aagcgcctta tttctgtgga gggtttattt tgtgtgactc cgtgaccggc acagcgtgcc 7260

gtgtggcaga ccccctaaaa aggctgttta agcttggcaa acctctggca gcagacgatg 7320

aacatgatga tgacaggaga agggcattgc atgaagagtc aacacgctgg aaccgagtgg 7380

gtattctttc agagctgtgc aaggcagtag aatcaaggta tgaaaccgta ggaacttcca 7440

tcatagttat ggccatgact actctagcta gcagtgttaa atcattcagc tacctgagag 7500

gggcccctat aactctctac ggctaacctg aatggactac gacatagtct agtcgacgcc 7560

accatggaac tgctgatcct gaaggccaac gccatcacca ccatcctgac cgccgtgacc 7620

ttctgcttcg ccagcggcca gaacatcacc gaggaattct accagagcac ctgcagcgcc 7680

gtgagcaagg gctacctgag cgccctgcgg accggctggt acaccagcgt gatcaccatc 7740

gagctgtcca acatcaaaga aaacaagtgc aacggcaccg acgccaaggt gaaactgatc 7800

aagcaggaac tggacaagta caagaacgcc gtgaccgagc tgcagctgct gatgcagagc 7860

acccccgcca ccaacaaccg ggccagaaga gagctgcccc ggttcatgaa ctacaccctg 7920

aacaacgcca agaaaaccaa cgtgaccctg agcaagaagc ggaagcggcg gttcctgggc 7980

ttcctgctgg gcgtgggcag cgccatcgcc agcggggtgg ccgtgtccaa ggtgctgcac 8040

ctggaaggcg aggtgaacaa gatcaagtcc gccctgctgt ccaccaacaa ggccgtggtg 8100

tccctgagca acggcgtgag cgtgctgacc agcaaggtgc tggatctgaa gaactacatc 8160

gacaagcagc tgctgcccat cgtgaacaag cagagctgca gcatcagcaa catcgagacc 8220

gtgatcgagt tccagcagaa gaacaaccgg ctgctggaaa tcacccggga gttcagcgtg 8280

aacgccggcg tgaccacccc cgtgagcacc tacatgctga ccaacagcga gctgctgtcc 8340

ctgatcaatg acatgcccat caccaacgac cagaaaaagc tgatgagcaa caacgtgcag 8400

atcgtgcggc agcagagcta ctccatcatg agcatcatca aagaagaggt gctggcctac 8460

gtggtgcagc tgcccctgta cggcgtgatc gacacccccт gctggaagct gcacaccagc 8520

cccctgtgca ccaccaacac caaagagggc agcaacatct gcctgacccg gaccgaccgg 8580

ggctggtact gcgacaacgc cggcagcgtg agcttcttcc cccaagccga gacctgcaag 8640

gtgcagagca accgggtgtt ctgcgacacc atgaacagcc tgaccctgcc ctccgaggtg 8700

aacctgtgca acgtggacat cttcaacccc aagtacgact gcaagatcat gacctccaag 8760

accgacgtga gcagctccgt gatcacctcc ctgggcgcca tcgtgagctg ctacggcaag 8820

accaagtgca ccgccagcaa caagaaccgg ggcatcatca agaccttcag caacggctgc 8880

gactacgtga gcaacaaggg cgtggacacc gtgagcgtgg gcaacacact gtactacgtg 8940

aataagcagg aaggcaagag cctgtacgtg aagggcgagc ccatcatcaa cttctacgac 9000

cccctggtgt tccccagcga cgagttcgac gccagcatca gccaggtcaa cgagaagatc 9060

aaccagagcc tggccttcat ccggaagagc gacgagctgc tgcacaatgt gaatgccggc 9120

aagagcacca ccaatatcat gatcaccaca atcatcatcg tgatcattgt gatcctgctg 9180

tctctgattg ccgtgggcct gctgctgtac tgcaaggccc gcagcacccc tgtgaccctg 9240

tccaaggacc agctgtccgg catcaacaat atcgccttct ccaactgaag tctagacggc 9300

gcgcccaccc agcggccgca tacagcagca attggcaagc tgcttacata gaactcgcgg 9360

cgattggcat gccgccttaa aatttttatt ttatttttct tttcttttcc gaatcggatt 9420

ttgtttttaa tatttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggtcggca 9480

tggcatctcc acctcctcgc ggtccgacct gggcatccga aggaggacgc acgtccactc 9540

ggatggctaa gggagagcca cgtttaaacc agctccaatt cgccctatag tgagtcgtat 9600

tacgcgcgct cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc 9660

caacttaatc gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc 9720

cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt 9780

agcggcgcat taagcgcggc gggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc 9840

agcgccctag cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc 9900

tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg 9960

cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga 10020

tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc 10080

caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg 10140

ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt 10200

aacaaaatat taacgcttac aatttaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc 10260

ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 10320

gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 10380

cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 10440

tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 10500

tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 10560

cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac 10620

tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa 10680

agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 10740

ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 10800

ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 10860

aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 10920

gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 10980

tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta 11040

ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc 11100

cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 11160

atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 11220

cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 11280

ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 11340

cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttt 11400

ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 11460

tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 11520

taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 11580

caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 11640

agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 11700

gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 11760

gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 11820

ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 11880

acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 11940

tgtgatgctc gtcaggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac 12000

ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt 12060

ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga 12120

ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc 12180

tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag 12240

cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt 12300

tacactttat gctcccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 12360

caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac 12420

aaaagctggg taccgggccc acgcgtaata cgactcacta tag 12463

<210> 102
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 102

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr
1				5				10					15		

Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		

Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			

Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
	50					55					60				

Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70					75					80

```
Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
                85                  90                  95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
    130                 135                 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
                165                 170                 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
    290                 295                 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
                325                 330                 335
```

```
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
            340                 345                 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
        355                 360                 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
            420                 425                 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
        435                 440                 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465                 470                 475                 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
                485                 490                 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Ile Asn Ile Met Ile Thr
        515                 520                 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
    530                 535                 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545                 550                 555                 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
                565                 570
```

<210> 103

<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 103

```
Met Glu Leu Leu Ile His Arg Leu Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1               5                  10                  15

Ile Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
            20                  25                  30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe 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 Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr 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 Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
            100                 105                 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
        115                 120                 125

Ile 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 Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn 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 Asn Asn Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Gly Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Asn Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240
```

```
Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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 Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Ile 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 Leu Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
565 570

<210> 104
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 104
Met Glu Leu Leu Ile His Arg Leu Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe 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 Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr 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 Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
115 120 125

Ile 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 Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145                 150                 155                 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn 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 Asn Asn Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
        195                 200                 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Asn Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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 Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
```

385 390 395 400

Asp Ile 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 Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
565 570

<210> 105
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 105
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe 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 Asn
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 Thr Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100                 105                 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
        115                 120                 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
    130                 135                 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile 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 Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
    210                 215                 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225                 230                 235                 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
            260                 265                 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
        275                 280                 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
```

290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr 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> 106
<211> 574
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 106
Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Val Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe 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 Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr 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 Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
115 120 125

Ile 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 Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn 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 Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn

195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu 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 Ser 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

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile 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 Asp 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 Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Ile 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 Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr 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 Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
565 570

<210> 107
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus sequence

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Leu or Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> His or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Arg or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Leu, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Ser or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Phe or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Leu or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Thr or Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Ala or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Ile, Val or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Asn or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Ala or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Leu or Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> Tyr or Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Leu or Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> Thr or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Ser or Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> Arg or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (45)..(45)
<223> Phe or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (67)..(67)
<223> Thr or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (74)..(74)
<223> Thr or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (80)..(80)
<223> Lys or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (99)..(99)
<223> Asn or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (101)..(101)
<223> Pro or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (103)..(103)
<223> Ala or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (111)..(111)
<223> Ala or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (113)..(113)
<223> Gln or Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (114)..(114)
<223> Tyr or Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (119)..(119)
<223> Ile or Leu

<220>
<221> MOD_RES

<222> (121)..(121)
<223> Thr or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (122)..(122)
<223> Thr or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (124)..(124)
<223> Asn or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> Leu or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (128)..(128)
<223> Ser or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (129)..(129)
<223> Ile or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (152)..(152)
<223> Ile or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (169)..(169)
<223> Asn or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (200)..(200)
<223> Asn or Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (201)..(201)
<223> Asn or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (202)..(202)
<223> Gln or Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (209)..(209)
<223> Gln or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (213)..(213)
<223> Arg or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (218)..(218)
<223> Gly, Glu or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (226)..(226)
<223> Lys or Met

<220>
<221> MOD_RES
<222> (228)..(228)
<223> Ser or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (234)..(234)
<223> Asn or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (247)..(247)
<223> Leu or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (276)..(276)
<223> Ser or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (305)..(305)
<223> Ile or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (326)..(326)
<223> Ile or Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (356)..(356)
<223> Asp or Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (380)..(380)
<223> Ser or Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (384)..(384)
<223> Thr or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (389)..(389)
<223> Ser or Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (402)..(402)

<223> Ile or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (462)..(462)
<223> Leu or Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (466)..(466)
<223> Asn or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (477)..(477)
<223> Tyr or Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (508)..(508)
<223> Arg or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (515)..(515)
<223> Asn or His

<220>
<221> MOD_RES
<222> (518)..(518)
<223> Thr or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (523)..(523)
<223> Thr or Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (537)..(537)
<223> Val or Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (544)..(544)
<223> Ile or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (553)..(553)
<223> Lys or Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (554)..(554)
<223> Asn or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (574)..(574)
<223> Lys or Asn

<400> 107

Met Glu Leu Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Xaa Gly Tyr Xaa 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 Xaa Lys Cys Asn Gly Thr Asp Xaa Lys Val Lys Leu Ile Xaa
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 Xaa Thr Xaa Ala Xaa Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Xaa Pro
100 105 110

Xaa Xaa Met Asn Tyr Thr Xaa Asn Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Asn Val Xaa
115 120 125

Xaa 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 Xaa Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Xaa 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 Xaa Xaa Xaa Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Xaa Gln Ser Cys Xaa Ile Ser Asn Ile Xaa Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Xaa Asn Xaa Arg Leu Leu Glu Ile Xaa Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Xaa 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 Xaa 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

Xaa Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305                 310                 315                 320

Leu Cys Thr Thr Asn Xaa 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 Xaa 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 Xaa Leu Cys Asn Xaa
    370                 375                 380

Asp Ile Phe Asn Xaa Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asp Xaa 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 Xaa Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Xaa Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Xaa 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 Xaa Ser Asp Glu Leu
            500                 505                 510
```

Leu His Xaa Val Asn Xaa Gly Lys Ser Thr Xaa Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Xaa Leu Leu Ser Leu Ile Ala Xaa
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Xaa Xaa Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Xaa
565 570

<210> 108
<211> 51
<212> PRT
<213> Human respiratory syncytial virus

<400> 108
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 109
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 109
Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Asn Gln Gln Gln Arg
1 5 10 15

Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
20 25 30

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag

<400> 110
His His His His His His
1 5

<210> 111
<211> 100
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(100)
<223> This sequence may encompass 3-100 Lys residues

<400> 111
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
50 55 60

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
65 70 75 80

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
85 90 95

Lys Lys Lys Lys
100

<210> 112
<211> 50
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 112

```
Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser
1               5                  10                  15

Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro
            20                  25                  30

Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe
        35                  40                  45

Ser Asn
    50
```

COMPOSICIONES DE PROTEINA F DE VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO (RSV) MODIFICADA

Antecedentes de la Invención

El virus sincitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés) es un virus de ARN, de hebra negativa, no segmentado, envuelto, en la familia *Paramyxoviridae*, género *Pneumovirus*. Es la causa más común de bronquitis y neumonía entre niños en su primer año de vida. El RSV también provoca infecciones repetitivas que incluyen enfermedad severa del tracto respiratorio inferior, que se presenta en cualquier edad, especialmente entre las personas de edad avanzada o aquellos con sistemas cardiacos, pulmonares o inmunitarios comprometidos.

Para infectar una célula hospedadora, los paramixovirus tal como RSV, como otros virus envueltos tal como virus de influenza y VIH, requieren la fusión de la membrana viral con la membrana de una célula hospedadora. Para el RSV, la proteína de fusión conservada (RSV-F) se fusiona a las membranas viral y celular por acoplamiento del repliegue proteico irreversible con yuxtaposición de las membranas. En los modelos actuales basados en estudios de paramixovirus, la proteína F de RSV se pliega inicialmente en una conformación de “pre-fusión” metaestable. Durante la entrada celular, la conformación de pre-fusión sufre

replegado y cambios conformacionales a su conformación de “post-fusión” estable.

La proteína F de RSV se traduce de ARNm en una proteína de aproximadamente 574 aminoácidos designada F_0. El procesamiento post-traduccional de F_0 incluye la remoción de un péptido de señal N-terminal por una peptidasa de señal en el retículo endoplásmico. También, F_0 se escinde en dos sitios (aproximadamente 109/110 y aproximadamente 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi. Esta escisión da por resultado la remoción de una secuencia de intervención corta y genera dos subunidades designadas F_1 (~50 kDa; C-terminal; aproximadamente los residuos 137-574) y F_2 (~20 kDa; N-terminal; aproximadamente los residuos 1-109) que permanecen asociadas entre sí. F_1 contiene un péptido de fusión, hidrófobo en su N-términal y también dos regiones de repetición heptad anfipáticas (HRA y HRB). La HRA está cerca del péptido de fusión y la HRB está cerca del dominio transmembrana. Se montan tres heterodímeros F_1-F_2 como heterotrímeros de F_1-F_2 en el virión.

Actualmente no está disponible, pero se desea una vacuna contra infección de RSV. Un planteamiento potencial para producir una vacuna es una vacuna de subunidades basada en proteína F de RSV, purificada. Sin embargo, para este planteamiento es deseable que la proteína F de RSV,

purificada, esté en una forma individual y una conformación que sea estable con el paso del tiempo, consistente entre lotes de vacuna, y convenientemente purificada.

La proteína F de RSV se puede truncar, por ejemplo, por supresión del dominio transmembrana y la extremidad citoplásmica, para permitir su expresión como un ectodominio, que puede ser soluble. Además, aunque la proteína F de RSV se traduce inicialmente como un monómero, los monómeros se escinden y montan en trímeros. Cuando la proteína F de RSV está en la forma de trímeros escindidos, se expone el péptido de fusión, hidrófobo. Los péptidos de fusión, hidrófobos, expuestos en diferentes trímeros, por ejemplo, trímeros de ecto-dominio solubles, pueden asociarse entre sí, dando por resultado la formación de rosetones. Los péptidos de fusión hidrófobos también pueden asociarse con lípidos y lipoproteínas, por ejemplo de células que se usan para expresar la proteína F de RSV, soluble, recombinante. Debido a la complejidad del procesamiento, estructura y replegado de la proteína F de RSV, son difíciles de obtener preparaciones inmunogénicas, homogéneas, purificadas.

De esta manera, existe la necesidad de composiciones mejoradas de proteína F de RSV y de métodos para producir composiciones de proteína F de RSV.

Breve Descripción de la Invención

La invención se refiere a composiciones

inmunogénicas que contienen uno o más polipéptidos F de RSV, y a ciertas proteínas F de RSV, manejas, y ácidos nucleicos que codifican para las proteínas F de RSV, manejadas.

En un aspecto, la proteína F de RSV es soluble. Por ejemplo, la proteína F de RSV puede tener la región transmembrana y las extremidad citoplásmica, suprimidas. En algunos aspectos, la F de RSV soluble contiene una o más de 1) una o más mutaciones en uno o ambos sitios de escisión de furina, 2) una o más mutaciones al péptido de fusión, 3) una o más mutaciones al ligador p27, 4) contiene una secuencia de oligomerización adicionada, y 5) contiene una secuencia de aminoácidos adicionada que proporciona un sitio de escisión de proteasa. En aspectos adicionales o alternativos, la proteína F de RSV es un monómero, un trímero, o una combinación de monómeros y trímeros. El trímero se puede monodispersar o estar en la forma de un rosetón. En aspectos adicionales o alternativos adicionales, la proteína F de RSV puede estar en una conformación de prefusión, una conformación intermedia o una conformación de post-fusión.

En un aspecto, la composición inmunogénica contiene uno o más polipéptidos F de virus sincitial respiratorio (F de RSV) en los cuales se reemplazan los aminoácidos 100-150 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13,

SEQ ID NO:91 o SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En otro aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido F de RSV en el cual se reemplazan los aminoácidos 100-150 del F de RSV con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En aún otro aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido F de RSV en el cual se reemplazan los aminoácidos 100-150 del F de RSV con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, o SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En otro aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido F de RSV en el cual se reemplazan los aminoácidos 100-150 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En otro aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido F de RSV en el cual F de RSV contiene los aminoácidos 23-99 y 151-524 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID

NO:2. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En un aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, y SEQ ID NO:93. En algunas modalidades, se omite el péptido de señal y/o la marca HIS. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En un aspecto, la composición inmunogénica contiene SEQ ID NO:68, o de manera alternativa, SEQ ID NO:68 en el cual se omite el péptido de señal, y opcionalmente la marca HIS.

En otro aspecto, la composición inmunogénica contiene un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:71, y cualquiera de las secuencias

anteriores en las cuales se omite el péptido de señal, y opcionalmente la marca HIS. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En modalidades preferidas, la composición inmunogénica incluirá un adyuvante. El adyuvante es preferentemente una sal de aluminio, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59), un compuesto de benzonaftiridina, un compuesto de fosfolípido (tal como E6020), un inmunopotenciador de molécula pequeña o una combinación de cualquiera de dos o más de cualquiera de lo anterior.

Aún otro aspecto de la invención incluye polipéptidos F de RSV, recombinantes. El F de RSV puede estar en la forma de un monómero, trímero, rosetón de trímeros, o combinación de monómeros y trímeros. El polipéptido recombinante puede incluir un dominio heterólogo de oligomerización, un epítopo o un péptido de señal. El dominio heterólogo de oligomerización es preferentemente un dominio de trimerización de hemaglutinina de influenza, de espiga de SARS, o de HIV gp41, NadA, GCN4 modificado, o ATCasa.

En un aspecto, el polipéptido F de RSV, recombinante tiene los aminoácidos 100-150 reemplazados con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7,

SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:91 o SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En otro aspecto, el polipéptido F de RSV, recombinante tiene los aminoácidos 100-150 del F de RSV reemplazados con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En otro aspecto, el polipéptido F de RSV recombinante tiene los aminoácidos 100-150 del F de RSV remplazados con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, o SEQ ID NO:92. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En aún otro aspecto, el polipéptido F de RSV recombinante tiene los aminoácidos 100-150 del F de RSV reemplazados con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

En un aspecto, el polipéptido recombinante se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID

NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, y SEQ ID NO:93, y cualquiera de las combinaciones de estas. Opcionalmente, se omite el péptido de señal y/o la marca HIS. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es soluble (por ejemplo, un ectodominio).

Aún otro aspecto incluye ácidos nucleicos que codifican para cualquiera de los polipéptidos anteriores. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARN auto-replicante.

Otro aspecto de la invención es una composición inmunogénica que comprende ARN auto-replicante que codifica para un polipéptido F de RSV. La composición inmunogénica puede incluir un sistema de distribución.

Otro aspecto de la invención incluye métodos para inducir una respuesta inmunitaria a F de RSV al administrar cualquiera de las composiciones inmunogénicas.

La invención se refiere a métodos para preparar composiciones y a composiciones que contienen la proteína F de RSV, tal como polipéptidos de ecto-dominio F de RSV,

solubles, incluyendo composiciones inmunogénicas. Los polipéptidos de ectodominio F de RSV pueden estar en una forma individual, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos o rosetones de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ectodominio F de RSV también pueden estar en dos o más formas, por ejemplo dos o más formas que existen en equilibrio, tal como el equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la presencia de una forma deseada individual de F de RSV en una composición inmunogénica proporciona una respuesta inmunitaria más predecible cuando la composición se administra a un sujeto, y estabilidad más consistente y otras características físicas y químicas cuando se formula en una vacuna.

En un aspecto, la invención es un método para producir una composición que comprende polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. El método incluye a) proporcionar polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen uno o más sitios de escisión de proteasa que, cuando se escinden, producen fragmentos F_1 y F_2, y b) escindir los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV con una proteasa o proteasas que reconocen el sitio o sitios de escisión de proteasa. En general, la secuencia de aminoácidos

de los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV contienen sitios alterados de escisión de furina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de RSV se segregan de una célula hospedadora que los produce no escindidos en una posición del aminoácidos 101 al aminoácidos 161, (por ejemplo, no escindido en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). En algunas modalidades, los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV proporcionados en a) se purifican.

Los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína de F de RSV proporcionados en a) pueden comprender un péptido de fusión intacto o un péptido de fusión alterado (por ejemplo, un péptido de fusión suprimido o un péptido de fusión mutado). Cuando los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV proporcionados en a) contienen un péptido de fusión intacto, la escisión en el paso b) da por resultado la formación de rosetones de trímeros. Cuando los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV proporcionados en a) comprenden un péptido de fusión alterado, la escisión en el paso b) da por resultado la formación de trímeros.

El método puede comprender además el paso opcional de purificar los rosetones o trímeros producidos al escindir los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. En modalidades preferidas, los polipéptidos

escindidos de ectodominio de proteína F de RSV producidos de acuerdo al método están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

En otro aspecto, la invención es un método para producir una composición que comprende monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. El método incluye a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV; y b) purificar del material biológico los monómeros o trímeros de polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV contienen sitios de escisión de furina, alterados, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de RSV se segregan de una célula hospedadora que los produce no escindidos en una posición del aminoácido 101 al aminoácidos 161, (por ejemplo, no escindido en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV contienen adicionalmente sitio alterados de escisión de tripsina, y los polipéptidos de ectodominio de proteína F de RSV no escindidos por tripsina en un sitio entre el aminoácido 101 y el aminoácido 161. En otras modalidades, la secuencia de

aminoácidos de los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV contienen además un péptido de fusión, alterado.

En algunas modalidades, los trímeros de polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV se purifican. En otras modalidades, se purifican los monómeros de polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. En aún otras modalidades, se purifica una mezcla de monómeros y trímeros no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV, que puede estar en un equilibrio dinámico. En modalidades preferidas, los polipéptidos no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV producidos de acuerdo al método están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

En otro aspecto, la invención es un método para producir una composición que comprende monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptidos escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. El método incluya a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos escindidos de ectodominio de proteína F de RSV que contienen un péptido alterado de fusión; y b) purificar polipéptidos escindidos de ectodominio de proteína F de RSV del material biológico.

En algunas modalidades, se purifican trímeros de polipéptidos escindidos de ectodominio de proteína F de RSV.

En otras modalidades, se purifican monómeros de polipéptidos escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. En aún otras modalidades, se purifica una mezcla de monómeros y trímeros de escindidos de ectodominio de proteína F de RSV, que pueden estar en un equilibrio dinámico. En modalidades preferidas, los polipéptidos escindidos de ectodominio de proteína F de RSV producidos de acuerdo al método están de manera sustancialmente preferente libres de lípidos de lipoproteínas. En aún otra modalidad, se purifica un trímero escindido de ectodominio de proteína F de RSV que contiene un péptido alterado de fusión.

En otros aspectos, la invención proporciona composiciones, incluyendo composiciones inmunogénicas, producidas usando los métodos de la invención.

Breve Descripción de las Figuras

Las Figuras 1A-1C muestran la vista esquemática del F de RSV tipo silvestre (Figura 1A) y de una construcción de ectodominio en la cual se han removido el dominio transmembrana y la extremidad citoplásmica y se ha adicionado una marca HIS6 opcional a C-términal (Figura 1B). Por claridad, se altera la numeración de los residuos al F de RSV cepa A2 tipo silvestre que empieza en el péptido de señal N-terminal y no se altera en construcciones que contienen supresiones de aminoácidos. Marcada en la vista esquemática está la secuencia de señal o péptido de señal (sp, por sus

siglas en inglés). La Figura 1A es una vista esquemática de la proteína F de RSV que muestra la secuencia de señal o el péptido de señal (SP), región ligadora p27, péptido de fusión (FP, por sus siglas en inglés), dominio HRA (HRA), dominio HRB (HRB), región transmembrana (TM) y extremidad citoplásmica (CT). Pueden variar las uniones C-terminales del ectodominio. La Figura 1B es una vista esquemática general de la construcción de ectodominio F de RSV que representa las características compartidas con la vista esquemática en la Figura 1A y que incluye una marca HIS_6 opcional (marca HIS). Los sitios de escisión de furina están presentes en las posiciones 109/110 y 136/137 de aminoácidos. La Figura 1C también muestra la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 100-150 de F de RSV (tipo silvestre) (SEQ ID NO:108) y varias proteínas (Furmt-SEQ ID NO:3; Furdel-SEQ ID NO:4; Furx-SEQ ID NO:6; Furx R113Q, K123N, K124N-SEQ ID NO:5; Furx R113Q, K123Q, K124Q-SEQ ID NO:92; Delp21 furx-SEQ ID NO:7; Delp23 furx- SEQ ID NO:8; Delp23 furdel-SEQ ID NO:9; N-términal Furin-SEQ ID NO:10; C-términal Furin-SEQ ID NO:11; Supresión 1 de Péptido de Fusión- SEQ ID NO:12; y Factor Xa-SEQ ID NO:13) en las cuales se mutaron o suprimieron uno o ambos sitios de escisión de furina y/o región de péptido de fusión. En la Figura 1C, el símbolo “-” indica que se suprimió el aminoácido en esa posición.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del

carboxi-término de la posición 488 de aminoácido al inicio de la región TM de F de RSV (tipo silvestre) (SEQ ID NO:94) y varias proteínas (SEQ ID NOS:95-100) que contiene sitios adicionados de escisión de proteasa. En la Figura 2, el símbolo "-" indica que no hay aminoácido en esa posición.

La Figura 3 es un cromatograma e imagen de un gel de electroforesis que muestra la purificación de monómeros F de RSV (3) usando cromatografía de exclusión de tamaño.

Las Figuras 4A-4F muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:101) del plásmido que codifica para la molécula de ARN auto-replicante de pT7-TC83R-FL.RSVF (A317) que codifica para la glicoproteína F de virus sincitial respiratorio (RSV-F). La secuencia de nucleótidos que codifica para RSV-F está subrayada.

La Figura 5 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de proteínas F de varias cepas de RSV. La alineación se preparó usando el algoritmo descrito por Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22):10881-10890, usando parámetros por omisión (tabla de comparación de símbolo Blossum 62, penalidad de abertura de separación: 12, penalidad de extensión de separación: A2, proteína F de la cepa A2 (número de acceso AF035006) (SEQ ID NO:102); proteína CP52 de de la cepa CP52 (número de acceso AF013255) (SEQ ID NO:103); proteína B, F de la cepa B (número de acceso AF013254) (SEQ ID NO:104); proteína F, larga de la cepa larga

(número de acceso AY911262) cepa (SEQ ID NO:105), y cepa 18537, proteína F de la cepa 18537 (número de acceso Swiss Prot P13843) (SEQ ID NO:106). También se muestra un consenso de secuencias de proteína F (SEQ ID NO:107).

Las Figuras 6A-6D muestra regiones pertinentes de cromatogramas de exclusión de tamaño (SEC) de purificaciones de antígenos F de RSV seleccionados. El pico principal que contiene el antígeno indicado se indica por un asterisco con el tiempo de retención de la columna Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) se indica en mililitros. En una columna calibrada, los tiempos de retención aproximados de 47 mls, 65 mls y 77 mls corresponden al volumen hueco de columna, el tiempo del trímero de F de RSV y la retención del monómero F de RSV, respectivamente. En la Figura 6A, la construcción Delp23 Furdel (Δp23 Furdel) no escindida se purifica del pico de monómero en aproximadamente 77 mls. Cuando el antígeno Delp23 Furdel RSV-F no escindido se trata con tripsina, la proteína puede formar rosetones, que ahora migran en SEC en el volumen hueco a aproximadamente 47 mls (Figura 6B). La especie de trímero escindida de la supresión de péptido de fusión F de RSV se purifica del pico de trímero en aproximadamente 65 mls de tiempo de retención (Figura 6C) en tanto que la construcción Delp21 Furx no escindida (Δp21 Furx) se purifica el pico de monómero a aproximadamente 77

mls (Figura 6D).

Las Figuras 7A-7D muestra imágenes EM representativas de antígenos F de RSV seleccionados. La Figura 7A muestra una imagen EM de RSV-F ∆p23 (Delp23) antes del tratamiento con tripsina. Las formas tipo muleta en la Figura 7A, consistentes con una conformación de trímero post-fusión, no siempre se observan en la construcción ∆p23 (Delp23) Furdel no escindida. Cuando la construcción ∆p23 (Delp23) Furdel se trata con tripsina y se purifica del volumen hueco de una columna SEC y se observa por EM, se encuentra que las proteínas tienen conformaciones adoptadas de rosetones (Figura 7B). Cuando la construcción de supresión de péptido de fusión F de RSV se purifica del pico de trímero en una columna SEC se observa una forma de muleta monodispersada, consistente con el trímero de post-fusión (Figura 7C). En la Figura 7D se muestran tres preparaciones de ya sea ∆p21 (Delp21) furx RSV-F (Monómero marcado), F de RSV con supresión de péptido de fusión (Sendas, Trímero Marcado) y rosetones de F de RSV purificado (Rosetones Marcados). El gel contiene varias sendas de norma GE Full Range Standard (norma de pesos moleculares se marcan a la izquierda del gel) en tanto que a la derecha del gel se indican los tiempos de retención aproximados de los fragmentos de F de RSV.

Las Figuras 8A-8C son gráficas que muestran que los

monómeros (Δp21 (Delp21) no escindidos), los rosetones de trímeros (Δp23 (Delp23) Furdel escindido), y trímeros (supresión de péptido de fusión) de polipéptidos de ectodominio F de RSV son inmunogénicos en ratas de algodón. Se midieron los títulos en suero de IgG anti-RSV y anticuerpos neutralizantes anti-RSV 2 semanas después de la 1era vacunación (2wp1), 3 semanas después de la 1era vacunación (3wp1), y/o 2 semanas después de la 2da vacunación (2wp2).

Descripción Detallada de la Invención

La invención se refiere a polipéptidos y/o proteínas F de virus sincitial respiratorio (F de RSV), composiciones inmunogénicas que comprenden polipéptidos y/o proteínas F de RSV, métodos para producir polipéptidos y/o proteínas F de RSV y composiciones que comprenden polipéptidos y/o proteínas F de RSV, y ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos y/o proteínas F de RSV.

En general, las composiciones inmunogénicas comprenden polipéptidos y/o proteínas F de RSV que contienen mutaciones (por ejemplo, reemplazos, supresiones o adiciones de aminoácidos) que proporcionan características benéficas, tal como uno o más de 1) conformación de pre-fusión o intermedia (sin post-fusión) estabilizada, 2) exposición reducida o eliminada del polipéptidos de fusión, 3) estabilidad mejorada (por ejemplo, agregación y/o degradación

reducida, y 4) proteína viral F1/F2 activa más cercanamente semejante. Estas características proporcionan ventajas para las composiciones inmunogénicas y para la elaboración de las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, como se describe en la presente, las conformaciones no de post-fusión de la proteína F de RSV (es decir, conformación de pre-fusión, conformaciones intermedias) pueden ser mejores inmunógenos y producir una mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes. La reducción o eliminación de la exposición del polipéptido de fusión, por ejemplo, al introducir mutaciones o supresiones en los sitios de escisión de furina, reducirá la hidrofobicidad del polipéptido y facilitará las purificaciones, y también reducirá o eliminará la proteína F de RSV de asociarse con membranas celulares en un sujeto a quien se administra la proteína. La estabilidad mejorada de la proteína facilita la producción de composiciones inmunogénicas en las cuales la proteína tiene una tendencia disminuida a agregarse o degradarse, lo que proporciona una respuesta inmunitaria más predecible cuando la composición se administra a un sujeto. Finalmente, los polipéptidos o proteínas F mutantes de RSV que se asemejan a la proteína viral F1/F2, por ejemplo por supresión de toda o parte de la región ligadora p27, pueden producir una mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes. Otras ventajas de la invención se describen en la presente.

La invención también se refiere a métodos para preparar composiciones que contienen proteína F de RSV, en particular polipéptidos de ectodominio F de RSV, y a composiciones que incluyen composiciones inmunogénicas que comprenden proteína F de RSV. De manera preferente, los polipéptidos de ectodominio F de RSV están en una forma individual o en un equilibrio dinámico entre formas conocidas.

Definiciones

Como se usa en la presente, “población” se refiere a más de un polipéptido o proteína F de RSV que está presente en una composición. La población puede ser sustancialmente homogénea, en la cual sustancialmente todos los polipéptidos o proteínas F de RSV son sustancialmente los mismos (por ejemplo, misma secuencia de aminoácidos, misma conformación), heterogénea, o tener un grado deseado de homogenicidad (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 99 % de los polipéptidos o proteínas F de RSV son de conformación de pre-fusión, son de conformación de post-fusión, son monómeros, son trímeros).

La “conformación de post-fusión” de la proteína F de RSV es un trímero caracterizado por la presencia de un fajo de seis hélices que comprende 3 regiones HRB y 3 regiones HRA.

La “conformación de pre-fusión” de la proteína F de RSV es una conformación caracterizada por un trímero que contiene una triple hélice que comprende tres regiones HRB.

Como se usa en la presente, “polipéptido de ectodominio F de RSV” se refiere a un polipéptido de proteína F de RSV que contiene sustancialmente la porción extracelular de proteína F de RSV, madura, con o sin el péptido de señal (por ejemplo, aproximadamente aminoácidos 1 a aproximadamente aminoácido 524, o aproximadamente aminoácido 22 a aproximadamente aminoácido 524), pero que carece del dominio transmembrana y la extremidad citoplásmica de la proteína F de RSV que se presenta de forma natural.

Como se usa en la presente, “polipéptido escindido de ectodominio F de RSV” se refiere a un polipéptido de ectodominio F de RSV que se ha escindido en una o más posiciones de aproximadamente 101/102 a aproximadamente 160/161 para producir dos subunidades, en el cual una de las subunidades comprende F_1 y la otra subunidad comprende F_2.

Como se usa en la presente, “polipéptido no escindido C-terminal de ectodominio F de RSV” se refiere a un polipéptido de ectodominio F de RSV que se escinde en una o

más posiciones de aproximadamente 101/102 a aproximadamente 131/132, y no se escinde en una o más posiciones de aproximadamente 132/133 a aproximadamente 160/161, para producir dos subunidades, en el cual, una de las subunidades comprende F_1 y la otra subunidad comprende F_2.

Como se usa en la presente, “polipéptido no escindido de ectodominio F de RSV” se refiere a un polipéptido de ectodominio F de RSV que no se escinde en una o más posiciones de aproximadamente 101/102 a aproximadamente 160/161. Un polipéptido no escindido de ectodominio F de RSV puede ser, por ejemplo, un monómero o un trímero.

Como se usa en la presente, “péptido de fusión” se refiere a los aminoácidos 137-154 de la proteína F de RSV.

Como se usa en la presente, “péptido alterado de fusión” se refiere a un péptido de fusión en el cual uno o más aminoácidos se reemplazan o suprimen independientemente, incluyendo reemplazo o supresión de todos los aminoácidos de las posiciones 137-154. De manera preferente, los polipéptidos escindidos de ectodominio F de RSV que contienen un “péptido alterado de fusión” no forman rosetones.

Como se usa en la presente, una proteína o polipéptido “purificado” es una proteína o polipéptido que se produce de forma recombinante o de manera sintética, o se produce por su hospedador natural, y se ha aislado de otros componentes del sistema de producción recombinante o

sintético u hospedador natural tal que la cantidad de la proteína con relación a otros componentes macromolares presentes en una composición sea sustancialmente mayor que aquella presente en una preparación cruda. En general, una proteína purificada será al menos aproximadamente 50 % homogénea y de manera más preferente al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 85, al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 95, o sustancialmente homogénea.

Como se usa en la presente, “sustancialmente libre de lípidos y lipoproteínas” se refiere a composiciones, proteínas y polipéptidos que están al menos aproximadamente 95 % libres de lípidos y lipoproteínas en una base en masa cuando la pureza de la proteína y/o polipéptido (por ejemplo, polipéptido F de RSV) se observa en un gel de SDS-PAGE y el contenido total de proteína se mide usando ya sea absorción UV280 o análisis BCA, y el contenido de lípido y lipoproteína se determina usando el ensayo de Fosfolipasa C (Wako, código no. 433-36201).

Como se usa en la presente, “sitio alterado de escisión de furina” se refiere a la secuencia de aminoácidos en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136 en la proteína F de RSV que se presenta de forma natural que se reconocen y escinden por furina o proteasas tipo furina, pero en un

polipéptido no escindido de ectodominio de proteína F de RSV contiene uno o más reemplazos de aminoácido, una o más supresiones de aminoácido, o una combinación de uno o más reemplazos de aminoácido y una o más supresiones de aminoácido, de modo que se segregue un polipéptido de ectodominio F de RSV que contiene un sitio alterado de escisión de furina de una célula que lo produce no escindido en el sitio alterado de escisión de furina.

Las características de los ectodominios de proteína F de RSV adecuados para el uso en esta invención se describen en la presente con referencia a aminoácidos particulares que se identifican por la posición del aminoácido en la secuencia de la proteína F de RSV de la cepa A2 (SEQ ID NO:1). Los ectodominios de proteína F de RSV pueden tener la secuencia de aminoácidos de la proteína F de la cepa A2 o cualquier otra cepa deseada. Cuando se usa el ectodominio de proteína F de una cepa diferente de la cepa A2, los aminoácidos de la proteína F se van numerar con referencia a la numeración de la proteína F de la cepa A2, con la inserción de separación es como se necesite. Esto se puede lograr al alinear la secuencia de cualquier proteína F de RSV deseada con la proteína F de la cepa A2, como se muestra en la presente para las proteínas F de la cepa A2, cepa CP52, cepa B, cepa larga, y la cepa 18537. Ver, Figura 5. De manera preferente se producen alineaciones de secuencia usando el algoritmo

descrito por Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22):10881-10890, usando parámetros por defecto (tabla de comparación de símbolos Blossum 62, penalidad de abertura de separación: 12, penalidad de extensión de separación: 2.

La invención proporciona polipéptidos y proteínas F de RSV, solubles y composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos y proteína F de RSV, solubles, así como composiciones que comprenden ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ARN auto-replicantes) que codifican para los polipéptidos y proteínas F de RSV, solubles.

Los polipéptidos F de RSV (por ejemplo, polipéptidos de ectodominio) pueden estar en cualquier forma deseada, tal como en una forma individual, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, o rosetones de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ectodominio F de RSV también pueden estar en dos o más formas, por ejemplo dos o más formas que existan en equilibrio, tal como equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos. La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la presencia de una forma deseada individual de RSV, o un equilibrio dinámico entre dos formas, en una composición inmunogénica, proporciona una formulación más predecible, solubilidad y estabilidad predecibles, y una respuesta inmunitaria más predecible cuando la composición se administra a un sujeto.

De manera preferente, los polipéptidos de ectodominio F de RSV están en una forma individual, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, rosetones de trímeros escindidos, o en un equilibrio dinámico entre un subconjunto de estas formas (por ejemplo, equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos).

En un aspecto de la invención, los polipéptidos y proteínas F de RSV están en una conformación de pre-fusión. Los epítopos de la conformación de pre-fusión pueden ser más capaces de producir anticuerpos que puedan reconocer y neutralizar viriones naturales.

En una modalidad de la invención, una composición inmunogénica comprende una población de glicoproteínas F de virus sincitial respiratorio en conformación de pre-fusión. En otro aspecto de la invención, una composición inmunogénica comprende una población de glicoproteínas F de virus sincitial respiratorio que desfavorecen la conformación de post-fusión en comparación a una población de glicoproteínas F de RSV, aisladas.

La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que exhibe un epítopo presente en una pre-fusión o en una conformación de fusión intermedia de glicoproteína F de virus sincitial respiratorio pero ausente la conformación de post-fusión de

la glicoproteína.

La Glicoproteína F

La glicoproteína F de RSV dirige la penetración viral por fusión entre la envoltura de virión y la membrana plasmática de la célula hospedadora. Es una proteína de membrana integral de una pasada tipo I que tiene cuatro dominios generales: secuencia de señal (SS) de translocación de ER N-terminal ectodominio (ED) dominio transmembrana (TM), y una extremidad citoplasmática (CT). La CT consiste de un residuo de cisteína, palmitoilado, individual. La secuencia de la proteína F está altamente conservada entre los aislados de RSV, pero está en evolución constante (7). Diferente de la mayoría de los paramixovirus, la proteína F en RSV puede mediar la entrada y formación de sincitio independiente de las otras proteínas virales (HN es usualmente necesario además de F en otros paramixovirus).

El ARNm de F de hRSV se traduce en una proteína precursora de 574 aminoácidos designada F_0, que contiene una secuencia de péptido de señal en el N-términal que se remueve por una peptidasa de señal en el retículo endoplásmico. F_0 se escinde en dos sitios (a.a. 109/110 y 136/137) por proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi, removiendo una secuencia de intervención, glicosilada, corta y generando dos subunidades designadas F1 (~50 kDa, C-términal, residuos 137-574) y F2 (~20 kDa; N-términal,

residuos 1-109) (Ver, por ejemplo, Figura. 1). F1 contiene un péptido de fusión hidrófobo en su N-términal y también dos regiones de repetición heptad hidrófobas (HRA y HRB). HRA está cerca del péptido de fusión y HRB está cerca al dominio transmembrana (Ver, por ejemplo, Figura 1). Los heterodímeros F1-F2 se montan como homotrímeros en el virión.

El RSV existe como un serotipo individual, pero tiene dos subgrupos antigénicos: A y B. Las glicoproteínas F de dos grupos son aproximadamente 90 % idénticas. El subgrupo A, el subgrupo B o una combinación o híbrido de ambos se pueden usar en la invención. Una secuencia de ejemplo para el subgrupo A es SEQ ID NO: 1 (cepa A2; GenBank GI: 138251; Suiza Prot P03420) y para el subgrupo B es SEQ ID NO: 2 (cepa 18537; GI: 138250, Swiss-Prot P13843). SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 son ambas secuencias de 574 aminoácidos. El péptido de señal en la cepa A2 es a.a. 1-21, pero en la cepa 18537 es 1-22. En ambas secuencias, el dominio TM es de aproximadamente a.a. 530-550, pero se ha reportado alternativamente como 525-548.

SEQ ID NO: 1

1 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE 60

61 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARRELPRFMNYTLN 120

121 NAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVS 180

181 LSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVN 240

241 AGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300

301 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV 360

361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT 420

421 KCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDP 480

481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIVILLS 540

541 LIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN 574

SEQ ID NO: 2

1 MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE 60

61 LSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNYTIN 120

121 TTKNLNVSISKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVS 180

181 LSNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVN 240

241 AGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300

301 VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV 360

361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT 420

421 KCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKNLYVKGEPIINYYDP 480

481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIVVLLS 540

541 LIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSK 574

La invención puede usar cualquier secuencia deseada de aminoácidos de F de RSV, tal como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o una secuencia que tiene identidad SEC ID NO: 1 o 2. Típicamente, tendrá al menos 75 % de identidad a SEC ID NO: 1 o 2, por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, de identidad a SEC ID NO: 1 o 2. La secuencia se puede encontrar de forma natural en RSV.

Donde la invención usa un ectodominio de proteína F, en totalidad o en parte, puede comprender:

(i) un polipéptido que comprende aproximadamente los aminoácidos 22-525 de SEQ ID NO: 1.

(ii) un polipéptido que comprende aproximadamente los aminoácidos 23-525 de SEQ ID NO: 2.

(iii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de identidad) a (i) o (ii).

(iv) un polipéptido que comprende un fragmento de (i), (ii) o (iii) en donde el fragmento comprende al menos un epítopo de proteína F. El fragmento será usualmente de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de largo, por ejemplo, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450 aminoácidos de largo.

El ectodominio puede ser una forma F_0 con o sin el péptido de señal, o puede comprender dos cadenas separadas de péptidos (por ejemplo, una subunidad F_1 y una subunidad F_2) que están asociadas entre sí, por ejemplo, las subunidades se pueden enlazar por un puente disulfuro. Por consiguiente, todo o una porción de aproximadamente el aminoácido 101 a aproximadamente 161, tal como los aminoácidos 110-136, pueden estar ausentes del ectodominio. De esta manera, el ectodominio, en totalidad o en parte, puede comprender:

(v) una primera cadena peptídica y una segundo

cadena peptídica que está asociada con la primera cadena de polipéptido, donde la primera cadena peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o aún 100 % de identidad) a aproximadamente el aminoácido 22 a aproximadamente el aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 o aproximadamente el aminoácido 23 a aproximadamente el aminoácido 101 de SEQ ID NO: 2, y la segunda cadena peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad (por ejemplo, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o aún 100 % de identidad) a aproximadamente el aminoácido 162 a aproximadamente el 525 de SEQ ID NO: 1 o aproximadamente los aminoácidos 162 a 525 de SEQ ID NO: 2.

(vi) una primera cadena peptídica y una segundo cadena peptídica que está asociada con la primera cadena de polipéptido, donde la primera cadena peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento de aproximadamente el aminoácido 22 a aproximadamente el aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 o de aproximadamente el aminoácido 23 a aproximadamente el aminoácido 109 de SEQ ID NO: 2, y la segunda cadena peptídica comprende un fragmento de aproximadamente el aminoácido 162 a aproximadamente el aminoácido 525 de SEQ ID NO: 1 o de aproximadamente el

aminoácido 161 a aproximadamente el aminoácido 525 de SEQ ID NO: 2. Uno o ambos de los fragmentos comprenderán al menos un epítopo de proteína F. El fragmento en primera cadena peptídica usualmente será de al menos 20 aminoácidos de largo, por ejemplo, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80 aminoácidos de largo. El fragmento en la segunda cadena peptídica usualmente será de al menos 100 aminoácidos de largo, por ejemplo, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450 aminoácidos de largo.

(vii) una molécula obtenible por digestión de furina de (i), (ii), (iii) o (iv).

De esta manera, una secuencia de aminoácidos usada con la invención se puede encontrar de forma natural dentro de la proteína F de RSV (por ejemplo, una proteína F soluble de RSV que carece de TM y CT, aproximadamente los aminoácidos 522-574 de SEQ ID NO: 1 o 2), y/o puede tener una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones (inserciones, supresiones o sustituciones) individuales de aminoácido con relación a una secuencia natural de RSV. Por ejemplo, se conoce mutar proteínas F para eliminar sus secuencias de escisión de furina, impidiendo de este modo el procesamiento

intracelular. En ciertas modalidades, la proteína F de RSV carece de TM y CT (aproximadamente los aminoácidos 522-574 de SEQ ID NO: 1 o 2) y contiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) mutaciones (inserciones, supresiones o sustituciones) individuales de aminoácido con relación a una secuencia natural de RSV.

Mutaciones de Escisión con Furina, Escisión con Tripsina y de Péptido de Fusión

Los polipéptidos o proteínas F de RSV pueden contener una o más mutaciones que impiden la escisión en uno o ambos de los sitios de escisión de furina (es decir, aminoácidos 109 y 136 de SEQ ID NOS: 1 y 2). Estas mutaciones pueden impedir la agregación de los polipéptidos o proteínas solubles y facilitar de este modo las purificaciones, para impedir la fusión célula-célula si la proteína F de RSV se expresa en la superficie de una célula, tal como, por expresión de un replicón viral (por ejemplo, partículas de replicón de alfavirus), o si la proteína F de RSV es un componentes de una partícula tipo virus. Estas mutaciones, solas o en combinación con otras mutaciones descritas en la presente, también puede estabilizar la proteína en la conformación de pre-fusión.

Los ejemplos de mutaciones adecuadas de escisión con furina incluyen el reemplazo de los residuos de

aminoácido 106-109 de SEQ ID NO: 1 o 2 con RARK (SEQ ID NO: 77), RARK (SEQ ID NO: 78), QAQN (SEQ ID NO: 79) o IEGR (SEQ ID NO: 80). De manera alternativa, o adicionalmente, se pueden reemplazar los residuos 133-136 de SEQ ID NO: 1 o 2 con RKKK (SEQ ID NO: 81), ΔΔΔR, QNQN (SEQ ID NO: 82), QQQR (SEQ ID NO: 83) o IEGR (SEQ ID NO: 80). (Δ indica que el residuo de aminoácidos se ha suprimido). Estas mutaciones se pueden combinar, si se desea, con otras mutaciones descritas en la presente, tal como mutaciones en la región p27 (aminoácidos 110-136 de SEQ ID NO: 1 o 2), incluyendo supresión de la región de p27 en totalidad o en parte.

Estas mutaciones de escisión de furina se pueden combinar, si se desea, con otras mutaciones descritas en la presente, tal como mutaciones de escisión con tripsina y mutaciones de péptido de fusión. Los ejemplos de mutaciones adecuadas de escisión con tripsina incluyen supresión de cualquier residuo de lisina o arginina entre aproximadamente la posición 101 y la posición 161 de SEQ ID NO: 1 o 2, o el reemplazo de cualquier residuo de lisina o arginina con un aminoácido diferente de lisina o arginina. Por ejemplo, los residuos lisina y/o arginina en la región p27 (aproximadamente los aminoácidos 110-136 de SEQ ID NOS: 1 o 2) se puede sustituir o suprimir, incluyendo la supresión de la región de p27 en totalidad o en parte.

De manera alternativa o adicionalmente a las

mutaciones de escisión con furina, los polipéptidos o proteínas F de RSV pueden contener una o más mutaciones en la región de péptido de fusión (aminoácidos 137 y 153 de SEQ ID NO: 1 o 2). Por ejemplo, esta región se puede suprimir en totalidad o en parte.

En modalidades particulares, la secuencia del residuo de aminoácidos 100-150 del polipéptido o proteína F de RSV, tal como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o los ecto-dominios solubles de esto, es

(Furmt) TPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKKKFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:3)

(Furdel)TPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKK---RFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:4)

(Furx) TPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:6)

(Furx R113Q, K123N, K124N)
TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNANNTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:5)

(Furx R113Q, K123Q, K124Q))

TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:92)

(Delp21Furx) TPATNNQAQN----------QNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:7)

(Delp23Furx)TPATNNQAQN----------QNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:8)

(Delp21 furdel)TPATNNRARQ----------QNQQQRFLGFLLGVGSAIAS

(SEQ ID NO:109)

(Delp23furdel)TPATNNRARQ----------QQQRFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:9)

(Furina N-términal) TPATNNRARRELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:10)

(Furina C-términal)TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIAS

(SEQ ID NO:11)

(Supresión 1 de péptido de fusión)TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR----- ----SAIAS (SEQ ID NO:12),

(Supresión 2 de péptido de fusión)TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRR-----GVGSAIAS (SEQ ID NO:91), o

(Factor Xa) TPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKIEGRFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:13); en donde el símbolo "-" indica que se suprime el aminoácido en esa posición.

Además de las mutaciones por escisión de furina y de péptido de fusión, o, de manera alternativa, los polipéptidos o proteínas F solubles de RSV, tal como aquellas que carecen de la región transmembrana y de la extremidad citoplásmica, pueden contener una o más secuencias de oligomerización. Cuando está presente una secuencia de oligomerización, es de manera preferente una secuencia de trimerización. Las secuencias adecuadas de oligomerización son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la extremidad en espiral de la proteínas de cremallera de leucina GCN4 de levadura, la secuencia de trimerización de fibritina T4 de bacteriófago ("foldón"), y el dominio de trímero de influenza HA. Estas y otras secuencias adecuadas de oligomerización se describen en mayor detalle en la presente.

En modalidades particulares, la secuencia del término carboxi del polipéptido o proteína F de RSV, iniciando de la posición 480, es

(GCN) PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE

(SEQ ID NO:14)

(HA) PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEK (SEQ ID NO:15)

(Hélice Idealizada) PLVFPSDEFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNIN (SEQ ID NO:16)

(foldon corto)

PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO:17); o

(foldon largo)

PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNNKNDDKGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO:18)

Además de cualquier combinación de mutaciones de escisión con furina, mutaciones de péptido de fusión y secuencias de oligomerización adicionadas o, de manera alternativa, los polipéptidos o proteínas F de RSV que contienen una región transmembrana puede contener una secuencia de aminoácidos adicionada que proporciona un sitio de escisión de proteasa. Este tipo de polipéptido o proteína F de RSV se puede producir por la expresión en la superficie de una célula, y recuperar en forma soluble después de la escisión de la superficie celular usando una proteasa apropiada. En general, la secuencia de aminoácidos que proporciona un sitio de escisión de proteasa estará localizada dentro de aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, o

sustancialmente adyacente al término amino del dominio transmembrana (aminoácido 525 de SEQ ID NO: 1 o 2). Muchas secuencias adecuadas de aminoácidos que se escinden por proteasas comercialmente disponibles son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la trombina escinde la secuencia LVPR (SEQ ID NO: 75), el factor Xa escinde la secuencia IEGR y la enterocinasa escinde la secuencia DDDDK (SEQ ID NO: 76). Estas secuencias de aminoácidos se pueden introducir en un polipéptido F de RSV. En modalidades particulares, la secuencia de polipéptido o proteína F de RSV, iniciando de la posición 488 a la región TM es una secuencia mostrada en la Figura 2.

Usualmente se aislarán o se purificarán los polipéptidos inmunogénicos usados de acuerdo a la invención. De esta manera, no se asociarán con moléculas con las cuales se encuentran normalmente, si es aplicable, en la naturaleza. Por ejemplo, una proteína F usada con la invención no estará en la forma de un virión de RSV (aunque puede estar en forma de un virión artificial, tal como una virosoma o VLP).

Usualmente se preparan polipéptidos por la expresión en un sistema hospedador recombinante. En general, ellos (por ejemplo, ecto-dominios de RSV) se producen por la expresión de construcciones recombinantes que codifican para los ecto-dominios en células hospedadoras, recombinantes, adecuadas, aunque se puede usar cualquiera de los métodos

adecuados. Las células hospedadoras, recombinantes, adecuadas incluyen, por ejemplo, células insectiles (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni)*, células mamíferas (por ejemplo, células de humano, primate no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato, y roedor (por ejemplo, hámster), aviares (por ejemplo, pollo, pato y ganso), bacterias (por ejemplo, E. coli, Bacillus subtilis y Streptococcus spp.), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenual polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillerimondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica)*, células de Tetrahymena (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de esto. Muchas células insectiles adecuadas y células mamíferas son bien conocidas en la técnica. Las células insectiles adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células Schneider S2 y células High Five (un aislado clonal derivado de las líneas de células Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 parental (Invitrogen)). Las células mamíferas adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células de riñón embriónico humano (células HEK293, típicamente transformadas por ADN de adenovirus tipo 5 sisallado), células NIH-3T3, células 293-T,

células Vero, células HeLa, células PERC.6 (número de depósito ECACC 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de mono rhesus fetal (ATCC CL-160), células de riñón bovino de Madin-Darby ("MDBK", por sus siglas en inglés), células de riñón canino de Madin-Darby ("MDCK", por sus siglas en inglés) (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34, o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células de riñón de hámster neonato (BHK, por sus siglas en inglés), tal como células BHK21-F, HKCC, y similares. Las células aviares adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embriónicas de pollo (por ejemplo, células EBx^{MR}), fibroblastos embriónicos de pollo, células germinales embriónicas de pollo, células de pato (por ejemplo, línea de células AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen), que se describen, por ejemplo, en *Vaccine* 27:4975-4982 (2009) y WO2005/042728), células EB66, y similares.

Los sistemas adecuados de expresión de células insectiles, tal como sistemas de baculovirus, se conocen por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células insectiles están comercialmente disponibles en forma de equipo de, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA. Los sistemas de expresión de células aviares también se conocen por aquellos

expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de los estados unidos Nos. 5,340,740, 5,656,479, 5,830,510, 6,114,168, y 6,500,668, patente europea No. EP 0787180B; solicitud de patente europea No. EP03291813.8; WO03/043415 y WO03/076601. De manera similar, los sistemas de expresión de células bacterianas y mamíferas también se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, *Yeast Genetic Engineering* (Barr *et al*., eds., 1989) Butterworths, Londres.

Las construcciones recombinantes que codifican para ecto-dominios de proteínas de F de RSV se pueden preparar en vectores adecuados usando métodos convencionales. Son bien conocidos y convencionales en la técnica varios vectores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes en células insectiles o mamíferas. Los vectores adecuados puede contener varios componentes que incluyen, pero no se limitan a uno o más de lo siguiente: un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, uno o más elementos de control de expresión, tal como un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor, un intensificador, un terminador), y/o una o más señales de traducción; y una secuencia de señal o secuencia guía para dirección al objetivo a la ruta secretoria en una célula hospedadora seleccionada (por ejemplo, de origen mamífero o de una especie mamífera o no mamífera heteróloga). Por ejemplo, para expresión en células

insectiles, se usa un vector adecuado de expresión de baculovirus, tal como pFastBac (Invitrogen), para producir partículas recombinantes de baculovirus. Las partículas de baculovirus se amplifican y se usan para infectar células insectiles para expresar proteína recombinante. Para expresión en células mamíferas, se usa un vector que activará la expresión de la construcción en la célula hospedadora, mamífera, deseada (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).

Los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos para purificar polipéptidos de ecto-dominio F de RSV por cromatografía de inmunoafinidad. *Ruiz-Argüello et al., J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004). Los métodos adecuados para purificar proteínas deseadas que incluyen precipitación y varios tipos de cromatografía, tal como interacción hidrófoba, intercambio iónico, afinidad, quelante y exclusión de tamaños son bien conocidos en la técnica. Los esquemas adecuados de purificación se pueden crear usando dos o más de estos u otros métodos adecuados. Si se desea, los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV pueden incluir una “marca” que facilita la purificación, tal como una marca de epítopo o una marca HIS. Estos polipéptidos marcados se pueden purificar de manera conveniente, por ejemplo, de medios

acondicionados, por cromatografía de quelación o cromatografía de afinidad.

Los polipéptidos F de RSV también se pueden producir *in situ* por la expresión de ácidos nucleicos que los codifican en las células de un sujeto. Por ejemplo, por la expresión de un ARN auto-replicante descrito en la presente.

Los polipéptidos pueden incluir secuencias adicionales, además de la secuencias de RSV. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir una secuencia para facilitar la purificación (por ejemplo, una secuencia de poly-His). De manera similar, para propósitos de expresión, la secuencia guía natural de la proteína F se puede sustituir por una diferente. Por ejemplo, la referencia 6 usó un péptido guía de melitina de abeja mielera en lugar de la natural.

Forma y Conformación de Polipéptidos

La invención incluye composiciones inmunogénicas que incluyen cualquiera de las formas y conformaciones de polipéptidos y proteínas F de RSV descritos en la presente, incluyendo cualquier combinación deseada de las formas y conformaciones de polipéptidos y proteínas F de RSV descritos en la presente. El polipéptido F de RSV puede ser un monómero, o la proteína F de RSV puede ser un trímero que comprende tres polipéptidos monoméricos. Los trímeros pueden estar monodispersados o puede estar en la forma de un rosetón, por ejemplo, debido a las interacciones entre los

péptidos de fusión de trímeros individuales. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender polipéptidos que son monómeros, trímeros, una combinación de monómeros y trímeros (por ejemplo, en equilibrio dinámico), rosetones de trímeros, y cualquier combinación de lo anterior. Además, como se describe adicionalmente en la presente, la proteína F de RSV puede estar en una conformación de post-fusión, una conformación de pre-fusión, o una conformación intermedia.

La proteína F de RSV puede estar en una conformación de post-fusión, o una conformación intermedia. La “conformación de post-fusión” de la proteína F de RSV se cree que es la conformación de baja energía de F de RSV nativa y es un trímero caracterizado por la presencia de un fajo de seis hélice que comprende 3 regiones HRB y 3 regiones HRA. La conformación de post-fusión tiene una forma de “muleta” o “palo de golf” característica por microscopía electrónica. La “conformación de pre-fusión” de la proteína F de RSV es una conformación caracterizada por un trímero que contiene una espiral enrollada que comprende 3 regiones HRB. El péptido de fusión no está expuesto en la conformación de pre-fusión y, por lo tanto, las conformaciones de pre-fusión en general no forman rosetones, y tienen una forma de “pirulí” o “bola y tallo” por microscopía electrónica.

En algunos aspectos, la proteína F de RSV está en la conformación de post-fusión. Por ejemplo, la proteína F de

RSV puede estar en la forma de un trímero monodisperso en la conformación de post-fusión, o en la forma de un rosetón comprendido de trímeros de post-fusión.

En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es un monómero. En algunas modalidades, el polipéptido F de RSV es un trímero.

En otros aspectos, la proteína F de RSV está en la conformación de pre-fusión. Sin que se desee que se una por alguna teoría particular, se cree que la conformación de pre-fusión o formas intermedias de la proteína F de RSV puede contener epítopos que son los mismos como aquellos en la proteína F de RSV expresada en viriones naturales de RSV, y por lo tanto proporcionan ventajas para producir anticuerpos neutralizantes.

Algunos aspectos de la invención usan un polipéptido que desfavorece la conformación de post-fusión de la proteína F. De manera preferente, los polipéptidos (en totalidad o en parte) exhibirán un epítopo de la proteína F de pre-fusión o un epítopo de una conformación intermedia en la conversión de la conformación de pre-fusión a la conformación de post-fusión. Estos polipéptidos pueden tener proteínas F nativas o mutadas en un estado de pre-fusión, puede ser proteínas F nativas o mutadas en una conformación intermedia, o pueden ser una población de proteínas nativas o mutadas, donde la conformación de post-fusión se ha

desfavorecido o se estudie de manera preferencial. En ciertos casos, la proteína nativa o mutada se puede combinar con una o más moléculas adicionales que ayudan a mantener los polipéptidos en uno de los estados anteriores, tal como un anticuerpo monoclonal que se une de manera preferente a la conformación de pre-fusión o una conformación intermedia. Además, los polipéptidos pueden ser derivados de proteínas F nativas. Estos derivados incluyen polipéptidos que comprenden uno o más fragmentos de una proteína F nativa, polipéptidos de fusión que comprenden una proteína F nativa (o fragmento de la misma) y una secuencia heteróloga, y polipéptidos que comprenden una secuencia de proteína F nativa que tiene una o más mutaciones. Estas (u otras) modificaciones pueden desfavorecer la conformación de post-fusión. Los planteamientos de ejemplo para desfavorecer la conformación de post-fusión incluyen estabilizar la conformación de pre-fusión, estabilizar una conformación intermedia, desestabilizar la conformación de post-fusión o incrementar la barrera de activación de uno o más pasos que conducen a la conformación de post-fusión.

En otra modalidad, la invención es un polipéptido que exhibe al menos un epítopo que se especificó a la proteína F de conformación de pre-fusión o una proteína F de conformación intermedia. Un epítopo que se específica a la proteína F de conformación de pre-fusión o una proteína F de

conformación intermedia es un epítopo que no está presente en la conformación de post-fusión. Se prefiere que al menos un epítopo se presente de forma estable, por ejemplo, el epítopo se presente de forma estable en solución durante al menos doce horas, al menos un día, al menos dos días, al menos cuatro días, al menos seis días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, o al menos seis semanas.

Estos polipéptidos pueden ser proteínas F nativas o mutadas en el estado de pre-fusión, un estado intermedio o de una población de estados donde el estado de post-fusión está subrepresentado o en un porcentaje menor que para las proteínas F nativas, aisladas, o puede ser un derivado de una proteína F nativa. Estos derivados incluyen polipéptidos que comprenden uno o más fragmentos de una proteína F nativa, polipéptidos de fusión que comprenden una proteína F nativa (o fragmento de la misma) y una secuencia heteróloga, y polipéptidos que comprenden una secuencia de proteína F nativa que tiene una o más mutaciones. Estas (u otras) modificaciones pueden estabilizar una secuencia de aminoácidos de proteína F en su conformación de pre-fusión, estabilizar una secuencia de aminoácidos de proteína F en una conformación intermedia, desestabilizar la conformación de post-fusión de una secuencia de aminoácidos de proteína F, incrementar la barrera de energía en una transición que

conduce a la conformación de post-fusión de una secuencia de aminoácidos de proteína F, o una combinación de dos o más de anterior.

Los dominios TM y/o CT de proteínas F son importantes para la estabilidad de la conformación de pre-fusión (8). De esta manera, estos dominios se pueden retener de forma útil en los inmunógenos de la invención. Puesto que puede ser deseable no incluir dominios transmembrana en inmunógenos solubles, aunque, el efecto funcional de TM se puede lograr por otros medios. Por ejemplo, el comportamiento de pre- y post-fusión de la proteína F del virus 5 de parainfluenza se ha estudiado en algún detalle (6), y los autores establecieron la estructura de pre-fusión de ED al fusionar un dominio heterólogo de trimerización al C-términal del ED.

Dominio de Oligomerización

En otra modalidad de la invención, la composición puede comprender un polipéptido (por ejemplo, polipéptido recombinante) que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde (i) el primer dominio comprende la proteína F de RSV (por ejemplo, ectodominio de RSV, en totalidad o en parte), y (ii) el segundo dominio comprende un dominio heterólogo de oligomerización. El segundo dominio permite la oligomerización del polipéptido, facilitando de este modo que el primer dominio adopte un estado de pre-fusión o un estado

intermedio. El polipéptido estará de manera preferente como un oligómero, y en particular como un trímero.

Para la persona experta en la técnica están disponibles varios dominios de oligomerización. Estas son secuencias de aminoácidos que pueden formar una estructura que puede interactuar con dominios de oligomerización (ya sea los mismos o diferentes) en otros polipéptidos (ya sea los mismos o diferentes) tal que los múltiples polipéptidos pueden asociarse (usualmente de forma no covalente) para formar oligómeros, por ejemplo, trímeros. Por ejemplo, se ha logrado la trimerización de la proteína F de VIH (es decir, gp160) al fusionarla a la subunidad catalítica de aspartato de transcarbamilasa de *E. coli* (ATCasa), que es de forma natural un trímero estable (9). De esta manera, esta subunidad de ATCasa se puede usar con la presente invención. De manera similar, la trimerización de las proteínas F de VIH (10) y PIV5 (6) se ha logrado al fusionar sus ectodominios a GCNt. De esta manera, el dominio de oligomerización usado con la presente invención puede comprender la espiral enrollada de la proteína de cremallera de leucina GCN4 de levadura (11). Se ha logrado la trimerización del ectodominio de la proteína HA del virus de influenza al usar una secuencia trimerizante (‘foldon’) de la fibritina T4 de bacteriófago (GSGYIPEAPRDGQ AYVRKDGEWVLLSTFL - SEQ ID NO: 19) (12). De esta manera, el dominio de

oligomerización usado con la presente invención puede comprender este foldon.

Los oligómeros de proteína que se presentan de forma natural (tanto hetero-oligómeros como homo-oligómeros) se asocian en una variedad de maneras diferentes, por ejemplo, por asociación de (β-hojas en diferentes monómeros, por asociación de α-hélices en diferentes monómeros, por asociación de parches superficiales hidrófobos, etcétera. Un motivo estructural común comprendido en la oligomerización de proteínas es el dominio de espiral enrollada. El motivo estructural de α-hélice enrollada puede formar por sí mismo espirales y dos, tres, cuatro o cinco α-hélices, pueden enrollarse entre sí para formar una súper-hélice izquierda conocida como la “espiral enrollada”, aunque la súper-hélices derechas artificiales se han designado (13-19). La simplicidad del dominio de espiral enrollada ha hecho una elección popular para diseñar proteínas quiméricas con estados definidos de oligomerización (16).

En una estructura espiral enrollada las α-hélices interactúan a través de residuos hidrófobos que forman una raya apolar a lo largo de un lado de cada hélice, y también puede haber interacciones electrostáticas estabilizadoras entre las cadenas laterales en cualquier lado de esta raya. Dentro de la repetición heptad abcdefg de una α-hélice, la raya apolar se define por las cadenas laterales hidrófobas en

los residuos a y d, con cualquier de las interacciones electrostáticas que están principalmente en los residuos e y g. La posición a es más frecuentemente Leu, Ile o Ala y la posición d es usualmente Leu o Ala. Los residuos e y g son frecuentemente Glu o Gln, con Arg y Lys también prominentes en la posición g. Los residuos cargados son comunes en las posiciones b, c y f puesto que estos residuos están en contacto con solvente. Hay excepciones a este patrón heptad general, sin embargo, y algunas veces se encuentran residuos Pro dentro del heptad. Estas excepciones usualmente tienen significado funcional, que incluye, a manera de ejemplo, desestabilización del dominio de oligomerización para permitir replegado y rearreglo, tal como se presenta en la proteína F.

Cientos de secuencias de dominio de espiral enrollada se conocen en la técnica, y se puede usar cualquier secuencia adecuada como un dominio de oligomerización con la invención, con la condición de que retenga la capacidad de oligomerizarse con otros dominios de espiral enrollada y que no destruya la función de los otros dominios dentro del polipéptido. Se prefiere usar una espiral enrollada que se encuentra de forma extracelular (20) y que actúa de manera natural como un dominio de oligomerización. Como una alternativa usar un dominio natural de espiral enrollada, se pueden usar dominios artificiales de espiral enrollada (21,

22). Debido a la estructura altamente repetitiva de un dominio de espiral enrollada, el dominio es particularmente tratable para modelado en computadora, puesto que las porciones de estructura de cada residuo de aminoácidos se pueden puede parameterizar en lugar de tratar cada porción de estructura de un residuo como una unidad única con sus propias variables. El dominio (b) puede incluir una secuencia de cremallera de leucina o una secuencia de cremallera alanina (23).

El dominio de espiral enrollada usado en el polipéptido de la invención es preferentemente uno que forma un trímero, tal que el polipéptido de la invención también se pueda montar en un trímero. Los dominios de espiral-enrollada, preferidos son aquellos tomados de proteínas transmembrana bacterianas. Un subconjunto preferido de proteínas transmembrana es las adhesinas (es decir, proteínas de superficie celular que median la adhesión a otras células o a superficies), y de manera particular a adhesinas no fimbriales (por ejemplo, en las adesinas de espiral enrolladas de oligomerización, o familia “Oca”). Las secuencias específicas para el uso con la invención incluyen aquellas descritas en la referencia 24 de adhesina YadA de Yersinia enterocolitica, adhesina NadA de Neisseria meningitidis, proteína superficial UspA2 de Moraxella catarrhalis, y otras adhesinas, tal como la adhesina HadA de

Haemophilus influenzae biogrupo aegyptius etcétera (SEQ ID NOs 28-31 y 42-58 de referencia 24). Además, el factor de transcripción de choque térmico eucariótico tiene un dominio de trimerización de espiral enrollada que se puede expresar de forma separada y por lo tanto usar con la invención.

Dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene una región de espiral enrollada, la naturaleza de repetición heptad de las α-hélices significa que el límite del dominio de espiral enrollada se puede determinar con alguna precisión, pero el residuo preciso donde se dice que termina un arreglo de espiral enrollada no se puede conocer con exactitud absoluta. Esta carencia de precisión absoluta no es un problema para practicar de la invención, sin embargo, como prueba de rutina se puede revelar si la espiral enrollada requiere algún residuo de aminoácido particular para el cual se pueda tener duda. Aún así, la invención no requiere que se conozcan los límites con precisión absoluta, puesto que el único requisito básico para la invención es que el dominio de espiral enrollada deba funcionar de una manera que permita que el polipéptido oligomérise con otros dominios de espiral enrollada sin destruir la función de los otros dominios dentro del polipéptido.

Otra clase de dominio de oligomerización que se puede usar con la invención se encuentra en la triple hélice

izquierda conocida como la hélice de colágeno (25). Estas secuencias formadoras de triple hélice comprenden una secuencia de repetición tripeptídica básica de ^{1}Gly-^{2}Xaa-^{3}Xaa, donde ^{2}Xaa es frecuentemente Pro, y ^{3}Xaa es frecuentemente 4-hidroxiprolina. Aunque este motivo se conoce como la “hélice de colágeno” se encuentra en muchas proteínas más allá de sólo colágeno. El dominio de oligomerización de esta manera puede ser una secuencia que comprende múltiples repeticiones del motivo de secuencia ^{1}Gly-^{2}Xaa-^{3}Xaa, o motivo se pliega para formar una estructura helicoidal que puede oligomerizarse con las estructuras helicoidales correspondiente en otras cadenas de polipéptido.

El colágeno también proporciona otra clase de dominio de oligomerización. La referencia 26 describe un motivo encontrado en el dominio 1 no de colágeno (NC1) de colágeno tipo X, y este motivo se puede usar para la formación de trímeros y multímeros de mayor orden sin un triple hélice. Esta asociación trimérica es altamente termoestable, sin enlaces de disulfuro intermoleculares. El dominio de oligomerización de esta manera puede comprender una secuencia de NC1.

Se pueden derivar otros dominios de oligomerización de los dominios transmembrana de proteínas TM oligoméricas. Puesto que estas son usualmente lipofilas, los residuos hidrófobos colocados en el exterior de sus regiones TM se

pueden sustituir con residuos cargados, para proporcionar un dominio soluble. Estos métodos para solubilizar dominios transmembrana por manejo de proteínas se conocen en la técnica, por ejemplo, de la referencia 27. Este método también se ha usado para GCN4, donde las posiciones de repetición heptad “a” y “d” se reemplazaron con isoleucina (11): KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA (SEQ ID NO: 20). Las secuencias adecuadas de espiral enrollada para el uso dentro del dominio de oligomerización usualmente serán de entre 20 y 35 aminoácidos de largo, por ejemplo, 23 a 30 residuos de aminoácidos de largo.

Los dominios de oligomerización usados con la invención pueden mantener en general una estructura oligomérica sin la necesidad de la formación de puentes de disulfuro inter-monómero, pero no se excluyen de la invención los oligómeros que contienen monómeros enlazados con disulfuro.

Como una alternativa, o adicionalmente, a usar un dominio de oligomerización para estabilizar una proteína F en su conformación de pre-fusión, se puede usar mutación. Por ejemplo, la referencia 28 reporta que la mutación en una región conservada de la subunidad F2 de las proteínas F en virus simiesco 5 o virus de hendra tiene influencia en la estabilidad de la conformación de pre-fusión.

En algunas casos, también se puede usar pH bajo

para favorecer la conformación de pre-fusión.

Estabilización del Trímero Dominio de HRB

En otro aspecto preferido de la presente invención, la conformación de post-fusión de la proteína F se puede desfavorecer por la estabilización del trímero de dominio HRB. El dominio de HRB forma una espiral enrollada de triple hebra en la pre-fusión y probablemente las formas intermedias. Como se analiza en la sección precedente, debido a su simplicidad, se han estudiado extensivamente las espirales enrolladas como sistemas modelo para interacciones intermoleculares entre proteínas y como sistemas modelo para interacciones intra-moleculares de intervalo grande (es decir, interacciones de plegado terciario). Estos estudios son útiles al enseñar métodos que se pueden usar para estabilizar el dominio de HRB en la forma de espiral enrollada trimérica. A manera de ejemplo, se pueden reemplazar uno o más residuos en las posiciones *a* y/o *d* de la repetición heptad con residuos que favorecen la formación de espirales enrolladas, trimérica estables, tal como residuos Ile. Además, aunque menos preferido, las interacciones iónicas desfavorables en las posiciones *e* y *g* se pueden suprimir o se pueden adicionar interacciones iónicas favorables en las posiciones *e* y *g*.

La región preferida del dominio de HRB para manipulación es la repetición heptad entre P484-N517. Los

ejemplos preferidos de residuos *a* y *d* de objetivo para mutaciones son F488, I492, V495, I499, S502, I506, S509, L512 y V516. Los residuos de serina son especialmente preferidos como reemplazo de los residuos hidrófilos con residuos hidrófobos que estabilizarán el núcleo hidrófobo de la espiral enrollada. Otro objetivo preferido será la fenilalanina con un residuo hidrófobo más pequeño que empacará mejor en el núcleo tal como una isoleucina.

Desestabilización del Trímero de Dominio de HRA

En otro aspecto preferido de la presente invención, la conformación de post-fusión de la proteína F se puede desfavorecer por desestabilización del trímero de dominio HRA. El dominio de HRA forma una espiral enrollada de triple hebra en la post-fusión y posiblemente una o más formas intermedias. A manera de ejemplo, se pueden reemplazar uno o más residuos en las posiciones *a* y/o *d* de la repetición heptad con residuos que desfavorecen la formación de espirales enrolladas, triméricas, estables. Además, aunque menos favorable, se pueden suprimir interacciones iónicas favorables en las posiciones *e* y *g* o se pueden adicionar interacciones iónicas desfavorables en las posiciones *e* y *g*. De manera preferente estas mutaciones se seleccionarán para que tengan impacto mínimo en la estabilidad del dominio de HRA en la conformación de pre-fusión como se puede modelar en base a estructuras cristalinas disponibles de la proteína F

de PIV5 en las formas de pre-fusión y post-fusión.

Otras Modificaciones

Además de las modificaciones anteriores, se pueden diseñar adicionalmente modificaciones en base al modelado molecular de las proteínas F de VSRH en base a las estructuras cristalinas disponibles de la proteína F de PIV5 en las formas de pre-fusión post-fusión. Se pueden hacer mutaciones que desestabilizan la conformación de post-fusión, tal como el plegado 6HB de los dominios HRA y HRB o que estabilizan la conformación de pre-fusión, tal como el plegado HRA en la conformación de pre-fusión. Además, la barrera de energía de las transiciones que conduce a la conformación de post-fusión se puede incrementar. En tanto que experto en la técnica apreciará que la estabilización de la conformación de inicio o la desestabilización de la conformación final puede tener el efecto de incrementar la barrera de energía, se pueden introducir otras modificaciones que afectan el estado mismo de transición.

Como un ejemplo adicional, los aminoácidos N-terminal al dominio HRB (aproximadamente 449-482, de manera preferente V459-F483) actúan como una “correa”, que permite que el dominio HRB se cambie de un lado del trímero de proteína F al otro lado de modo que el dominio HRB puede participar en el 6HB de la conformación de post-fusión. La supresión de uno o más de estos aminoácidos deteriorarán o

impedirá categóricamente que el dominio HRB participe en el plegado 6HB de la conformación de post-fusión de la proteína F (ver Figura 3). Además, la interacción entre la correa y la proteína F en la conformación de pre-fusión se puede estabilizar para impedir que la correa jale para permitir que el dominio HRB participe en el plegado 6HB. Los ejemplos de mutaciones estabilizadoras que se pueden hacer son puentes de cisteína entre la correa y la porción de la proteína F con la que se pone en contacto la correa en la conformación de pre-fusión.

Aún otro ejemplo es la estabilización de la HRA en la conformación de pre-fusión (residuos T50-Y306). Nuevamente, en base a las estructuras cristalinas de proteínas F homólogas, el núcleo hidrófobo se puede estabilizar al reemplazar residuos hidrófilos o iónicos enterrados con residuos hidrófobos de tamaño similar. También, se pueden introducir puentes de cisteína en la superficie o dentro del núcleo. Además, como se demostró con el análisis extenso de estructuras cristalinas de mutantes de lisozima, los núcleos o proteínas hidrófobas son relativamente rígidas y por lo tanto, la introducción de agujeros desestabilizó de forma predictiva los mutantes de lisozima. De manera similar, el reemplazo del núcleo de la proteína F en la conformación de pre-fusión para eliminar cualquier agujero natural puede estabilizar la proteína F en

la forma de pre-fusión o intermedia, desfavoreciendo de este modo la conformación de post-fusión.

Métodos para Preparar Composiciones

La invención se refiere a métodos para preparar composiciones y a composiciones que contienen proteína F de RSV, en particular, polipéptidos de ecto-dominio F de RSV solubles, incluyendo composiciones inmunogénicas. De manera preferente, los polipéptidos de ecto-dominio de F de RSV están en una forma individual, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, rosetones de trímeros escindidos, o en un equilibrio dinámico entre un subconjunto de estas formas (por ejemplo, equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos). La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, como se describe en la presente, la invención proporciona métodos para producir composiciones que contienen una forma deseada predominante de proteínas F de RSV, o una forma deseada individual de proteína F de RSV, tal como monómeros no escindidos, trímeros no escindidos, trímeros escindidos, rosetones de trímeros escindidos, un equilibrio dinámico entre un subconjunto de estas formas (por ejemplo, equilibrio entre monómeros no escindidos y trímeros no escindidos), o una mezcla de forma deseada de proteína F de RSV. Estos tipos de composiciones se pueden usar para una variedad de propósitos, tal como, en la producción de composiciones

inmunogénicas que se pueden usar para producir vacunas. La presencia de una forma deseada individual de F de RSV, o un equilibrio dinámico entre formas conocidas, en una composición inmunogénica, proporciona una formulación más predecible, una solubilidad y una estabilidad más predecibles, y una respuesta inmunitaria más predecible cuando la composición se administra a un sujeto.

Cuando los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se producen por expresión recombinante convencional en células hospedadora, los polipéptidos se escinden en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y en aproximadamente la posición 136/137 durante la producción en la célula hospedadora antes de que se segreguen en el medio de cultivo. La escisión de los polipéptidos por las células hospedadoras es permisible para el replegado de polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV, que da por resultado la exposición del péptido de fusión hidrófobo. Por consiguiente, los polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de VSR, debido a la presencia de un péptido de fusión expuesto, forman rosetones y se asocian con lípidos y proteínas que se derivan de las células hospedadoras y medio de cultivo. En realidad, la microscopía electrónica del ecto-dominio escindido F de RSV que se producen en células insectiles y se purifican en virtud de una marca HIS_6 mostró que los polipéptidos tienen una forma de muleta consistente

con una forma de post-fusión y estuvieron unidos a lo que pareció ser desechos celulares residuales. Por consiguiente, no se pueden obtener fácilmente preparaciones de alta pureza de rosetones y otras formas y confirmaciones de polipéptidos de ecto-dominio proteína F de RSV por expresión recombinante convencional en células hospedadoras.

Métodos para Producir Polipéptidos Escindidos de Ecto-Dominio de Proteína F de RSV

En un aspecto, la invención es un método para preparar una composición que contiene polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. En general, el método comprende proporcionar polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV y luego escindirlos para producir una subunidad F_1 y una subunidad F_2. Como se describe en la presente, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar y separar fácilmente de lípidos y lipoproteínas contaminantes usando métodos adecuados, tal como cromatografía de exclusión de tamaño. Sin que se desee que se una a alguna teoría particular, se cree que el péptido de fusión hidrófobo no está expuesto en los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV y, por tanto, los polipéptidos no escindidos no se asocian con los contaminantes de lípidos y lipoproteínas. Como se describe adicionalmente en la presente, los ecto-dominios no escindidos de proteína F de

RSV se pueden escindir para producir las subunidades F_1 y F_2, que se pueden purificar como trímeros, rosetones de trímeros, o una mezcla de trímeros y rosetones de trímeros.

Los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden producir usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, por producción recombinante en células hospedadoras que no contienen furina activa o proteasas tipo furina en el momento en que se están produciendo los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Se pueden usar una variedad de métodos para lograr este método de producción, tal como, producción en células hospedadoras recombinantes que se mutan para impedir la expresión de furina o proteasa tipo furina (“supresión” condicional o completas), y varios métodos que reducen o impiden la expresión de furina o proteasas tipo furina en las células hospedadoras, por ejemplo, usando interferencia de ARN u otros métodos similares, o inhibiendo la actividad de furina o proteasas tipo furina en células hospedadoras usando inhibidores de las proteasas.

Los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se producen de manera preferente por expresión recombinante de construcciones que codifican para un ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual se altera la secuencia de aminoácidos en los sitios escisión de o con furina, de modo que los polipéptidos de ecto-dominio de

proteína F de RSV se segregan por una célula hospedadora que produce los polipéptidos no escindidos. Los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden producir usando cualquier célula hospedadora adecuada, tal como células insectiles (por ejemplo, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni)*, células mamíferas (por ejemplo, células de humano, primate no humano, caballo, vaca, oveja, perro, gato y roedor (por ejemplo, hámster), células aviares (por ejemplo, pollo, pato y ganso, bacterias (por ejemplo, E. coli, Bacillus subtilis y Streptococcus spp.), células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenual polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillerimondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe y Yarrowia lipolytica*), células de Tetrahymena (por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*) o combinaciones de estas. Muchas células insectiles adecuadas y células mamíferas adecuadas son bien conocidas en la técnica. Las células insectiles adecuadas, incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células Schneider S2 y células High Five (un aislado clonal derivado de la línea de células BTI-TN-5B1-4 de Trichoplusia ni parenteral (Invitrogen)). Las células mamíferas adecuadas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embriónico

humano (células HEK293, típicamente transformadas por ADN cizallado de adenovirus tipo 5), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, células HeLa, células PERC.6 (depósito ECACC número 96022940), células Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de mono rhesus fetal (ATCC CL-160), células de riñón bovino de Madin Darby (“MDBK”), células de riñón canino de Madin-Darby (“MDCK”), (por ejemplo, MDCK (NBL2), ATCC CCL34, o MDCK 33016, DSM ACC 2219), células riñón de hámster neonato (BHK), tal como células BHK21-F, HKCC, y similares. Las células aviares adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embriónicas de pollo (por ejemplo, células EBx^{MR}), fibroblastos embriónicos de pollo, células germinales embriónicas de pollo, células de pato (por ejemplo, línea de células AGE1.CR y AGE1.CR.pIX (ProBioGen), que se describen, por ejemplo, en *Vaccine* 27:4975-4982 (2009) y WO2005/042728), células EB66, y similares.

Los sistemas adecuados de expresión de células insectiles, tal como sistemas de baculovirus, se conocen por aquellos expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555 (1987). Los materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células insectiles están comercialmente disponibles en forma de equipo de, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA. Los sistemas de

expresión de células aviares también se conocen por aquellos expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de los estados unidos Nos. 5,340,740, 5,656,479, 5,830,510, 6,114,168, y 6,500,668, Patente Europea No. EP 0787180B; Solicitud de Patente Europea No. EP03291813.8; WO03/043415 y WO03/076601 WO. De manera similar, también en la técnica se conocen sistemas de expresión de células bacterianas y mamíferas y se describen en, por ejemplo, *Yeast Genetic Engineering* (Barr *et al*., eds., 1989) Butterworths, Londres.

En general, la secuencia de aminoácidos de un ecto-dominio no escindido de proteína F de RSV se altera para impedir la escisión en los sitios de escisión con furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de proteasa, que se presenta de forma natural o que se introduce, que cuando se escinde produce una subunidad F_1 y una subunidad F_2. Por ejemplo, el polipéptido no escindido de ecto-dominio proteína F de RSV puede tener una secuencia de aminoácidos que se altera para impedir la escisión en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137, pero contienen una o más sitios de escisión de proteasa que se presenta de forma natural o que se introducen de aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161.

Una variedad de secuencias particulares de aminoácidos que permitirá que se produzcan y expresen por células hospedadoras los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, incluyendo secuencias de aminoácidos que no se escinden en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y en aproximadamente la posición 136/137 se pueden diseñar y contemplar fácilmente por un experto en la técnica. En general, se reemplazan o suprimen independientemente uno o más aminoácidos que son parte de, o que están localizados cerca de, los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110 y aproximadamente la posición 136/137. Algunas sustituciones y supresiones de aminoácido que son adecuadas para impedir la escisión de los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se conocen. Por ejemplo, las sustituciones R108N, R109N, R108N/R109N, que inhibe la escisión en 109/110, y la sustitución K131Q o la supresión de los aminoácidos en las posiciones 131-134, que inhiben la escisión en 136/137, se han descrito en González-Reyes *et al., Proc. Natl. Acad. Sci*. *E.U.A*, 98:9859-9864 (2001). Un polipéptido no escindido de ecto-dominio F de RSV que contiene las sustituciones de aminoácidos R108N/R109N/K131Q/R133Q/R135Q/R136Q se ha descrito. *Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol*. 85:3677687 (2004). Como se describe en detalle en la presente, las secuencias

adicionales de aminoácidos de proteína F de RSV que dan por resultados que el polipéptido de ecto-dominio F de RSV se segregue de una célula hospedadora no escindida contienen sitios alterados de escisión con furina, por ejemplo, alteran secuencias de aminoácidos en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136. Los sitios alterados de escisión con furina contienen al menos una sustitución o supresión de aminoácido en aproximadamente las posiciones 106-109, y al menos una sustitución o supresión de aminoácido en aproximadamente las posiciones 133-136.

De manera similar, una variedad de secuencias particulares de aminoácidos de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, que se presenta de forma natural o se introduce) que cuando se escinden producen una primera subunidad que comprende una F_1 y una segunda subunidad que comprende F_2, son posibles y se pueden diseñan y contemplar fácilmente. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína F de RSV de aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 contiene sitios de escisión de tripsina, y se pueden escindir uno o más de los sitios de escisión de tripsina por tripsina para generar las subunidades F_1 y F_2. Si se desea, se pueden introducir uno o más sitios adecuados de reconocimiento de

proteasa en el polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV, por ejemplo, entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161. Los sitios introducidos de reconocimiento de proteasa se pueden escindir usando la proteasa apropiada para generar subunidades F_1 y F_2. Cuando se introduce un sitio de reconocimiento de proteasa en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV, se prefiere que el sitio se reconozca por una proteasa que no escinde el ecto-dominio de la proteína F de RSV que se presenta de forma natural.

El método de este aspecto de la invención incluye: a) proporciona polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un sitio de escisión de proteasa que, cuando se escinde, produce subunidades F_1 y F_2, y b) escindir los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV con una proteasa que conoce el sitio de escisión de proteasa. En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV con tienen sitios alterados de escisión de furina, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se segregan de una célula hospedadora que los produce no escindidos en los sitios de escisión de furina en aproximadamente las aproximadamente 106-109 y aproximadamente las posiciones 131-136.

Los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, se pueden purificar al grado deseado. Por ejemplo, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, se pueden proporcionar como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular que está sustancialmente sin procesar (por ejemplo, no procesado, o sólo clarificado), o en forma parcial o sustancialmente purificada. En ejemplos particulares, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, se proporcionan en medio acondicionado de cultivo celular seleccionado del grupo que consiste de medio acondicionado de células insectiles, medio acondicionado s de células mamíferas, medio acondicionado de células aviares, medio acondicionado de células de levadura, medio acondicionado de células de Tetrahymena, y combinaciones de esto.

Se prefiere en general que los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, se purifiquen, por ejemplo, se purifiquen para que sean al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o sustancialmente homogéneos. Como se escribe en la presente, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar

fácilmente de lípidos y lipoproteínas, en tanto que las formas escindidas convencionalmente producidas de proteína F de RSV se co-purifican con contaminantes de lípidos y lipoproteínas. Por consiguiente, cuando se proporcionan polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, purificados, el método se puede usar para producir fácilmente una composición que contiene ecto-dominios escindidos de proteína F de RSV que están sustancialmente libres de lípidos o lipoproteínas.

En la técnica son bien conocidos y convencionales los métodos adecuados para escindir polipéptidos usando una proteasa. En general, los polipéptidos que se van a escindir se combinan con una cantidad suficiente de proteasa bajo condiciones (por ejemplo, pH, concentración de polipéptido de proteasa, temperatura) adecuadas para la escisión de polipéptido. Muchas proteasas adecuadas están comercialmente disponibles, y las condiciones adecuadas para realizar la escisión de polipéptidos son bien conocidas para muchas proteasas. Si se desea, los polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar después de la escisión con proteasa. En un ejemplo del método, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se proporcionan que contienen un péptido intacto de fusión, tal como un polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual no se sustituye ni suprimen

ninguno de los aminoácidos de las posiciones 137-154. En algunas modalidades, se purifican los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados. Los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, que contienen un péptido intacto de fusión, se escinden, y la escisión da por resultado la formación de rosetones de trímeros de polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Si se desea, los rosetones se pueden purificar adicionalmente usando cualquiera de los métodos adecuados, tal como cromatografía de exclusión de tamaño.

En otro ejemplo del método, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se proporcionan que contienen un péptido alterado de fusión, tal como un polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual se suprimen aproximadamente los aminoácidos 137-152, aproximadamente los aminoácidos 137-153, aproximadamente los aminoácidos 137-145 o aproximadamente los aminoácidos 137-142. También se han descrito otras supresiones adecuadas del péptido de fusión, tal como la supresión de los aminoácidos en las posiciones 137-146. *Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol*., 85:3677-3687 (2004).

En algunas modalidades, se purifican los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados. Se escinden los polipéptidos no

escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, y la escisión da por resultado la formación de trímeros de polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Si se desea, los trímeros se pueden purificar usando adicionalmente cualquiera de los métodos adecuados, tal como cromatografía de exclusión de tamaño.

En ejemplos particulares del método, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados contienen al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de furdel y delp23 furdel (por ejemplo, furdel escindible con tripsina, homogénea, delp23 furdel escindible con tripsina, homogéneo, o una mezcla de furdel escindible con tripsina y delp23 furdel escindible con tripsina). Los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, se escinden, por ejemplo con tripsina, y la escisión da por resultado la formación de trímeros escindidos, rosetones de trímeros escindidos, o una combinación de trímeros escindidos y rosetones de trímeros escindidos de polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Si se desea, los trímeros escindidos y/o rosetones de trímeros escindidos se pueden purificar adicionalmente usando cualquiera de los métodos adecuados, tal como cromatografía de exclusión de tamaño.

<u>Métodos para Producir Polipéptidos no Escindidos de Ecto-Dominio de Proteína F de RSV</u>

En otro aspecto, la invención es un método para preparar una composición que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. En general, el método comprende proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, tal como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular, y luego se purifican los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Como se describe en el presente, se ha descubierto que los monómeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, purificados, pueden auto-asociarse para formar trímeros no escindidos, y que hay una mezcla de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos o un equilibrio entre los monómeros no escindidos y trímeros no escindidos. Sin desear que se una alguna teoría particular, se cree que el equilibrio favorece el monómero, pero que el equilibrio cambiará hacia el trímero en soluciones concentradas.

El método de este aspecto de la invención incluye: a) proporcionar material biológicos que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, tal como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular; y b) purificar monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV del material

biológicos. En algunas modalidades, se purifican monómeros no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, o se purifican trímeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, o se purifican monómeros y trímeros.

En general, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene sitios alterados de escisión de o con furina, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se segregan de una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 (incluyendo en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). En ejemplos más particulares, el material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV; incluye al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de furmt, furdel, delp21 furx, delp23 furx, delp21 furdel, delp23 furdel, y la construcción de factor Xa, que se puede escindir usando el factor Xa.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene sitios alterados de escisión de furina, y otros sitios de escisión de proteasa, (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se alteran o suprimen para

impedir la escisión con proteasa (por ejemplo, con tripsina). Por ejemplo, es bien conocido que tripsina escinde después de los residuos de lisia y arginina. En ciertas modalidades preferidas, la secuencia de aminoácidos del polipéptido no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene sitios alterados de escisión de furina, se suprimen o reemplazan uno o más residuos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los residuos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 con un aminoácido que no es lisina y arginina, los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se segregan en una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161. De manera preferente, los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV no se escinden por tripsina cuando una solución de 1 mg/ml de polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV (diluido en Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 300 mM) se trata con un volumen uno-uno mil de solución de tripsina (tripsina de plasma bovino diluida a una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM; relación de masa final en reacción de digestión es 0.001:1 tripsina: ecto-dominio F de RSV; tripsina usada a 10-15

unidades BAEE por mg de proteínas) durante 1 hora a 37°C.

Si se desea, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV (por ejemplo, los polipéptidos que contienen sitios alterados de escisión de furina, y el polipéptido que contiene sitios alterados de escisión de furina y sitios alterados de escisión de tripsina) puede contener adicionalmente un péptido de fusión alterado, tal como un polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual, por ejemplo, se reemplazan aproximadamente los aminoácidos 137-152, se reemplazan aproximadamente los aminoácidos 137-154, se reemplazan aproximadamente los aminoácidos 137-145 o se reemplazan aproximadamente los aminoácidos 137-142. También se han descrito otras supresiones adecuadas de péptido de fusión, tal como la supresión de los aminoácidos en las posiciones 137-146. *Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004).

En modalidades particulares, el método incluye: a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, tal como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene sitios alterados de escisión con o de furina, los residuos de lisina y arginina presentes entre aproximadamente

la posición 101 y aproximadamente la posición 161 se suprimen o reemplazan con un aminoácido que no es lisina ni arginina, los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se segregan de una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161; y b) purificar monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV del material biológico.

En ejemplos más particulares, el material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, incluye al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de Furx, Furx R113Q K123N K124N, delp21 furx y delp23 furx.

En otras modalidades particulares, el método incluye: a) proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV en los cuales se muta el péptido de fusión (por ejemplo, al menos una porción del polipéptido de fusión se suprime), tal como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular; y b) purificar polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV del

material biológico. El polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV puede contener sitios alterados de escisión de furina, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se segregan en una célula hospedadora que los produce no escindidos entre aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 (que incluye en los sitios de escisión de furina en las posiciones 106-109 y 131-136). Si se desea, el polipéptido no escindido de ecto-dominio de proteína F de RSV con sitios alterados de escisión de furina contiene además sitios alterados o suprimidos para otra proteasa (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 para impedir la escisión con o de proteasa (por ejemplo, con o de tripsina). Por ejemplo, se suprimen o reemplazan uno o más residuos de lisina y/o arginina, (por ejemplo, todos los residuos de lisina y arginina) presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 con un aminoácido que no es lisina ni ariginina, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161.

Los monómeros, trímeros y combinaciones de monómeros y trímeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar al grado seseado. En general se prefiere que los monómeros o trímeros

de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se purifiquen, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o sustancialmente homólogos. Como se describe en la presente, los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaño. Por consiguiente, el método se puede usar para producir fácilmente una composición que contiene monómeros, trímeros o una combinación de monómeros y trímeros de polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas.

En un ejemplo, el método incluye proporcionar medio acondicionado de cultivo de células insectiles, medio acondicionado de cultivo de células mamíferas, medio acondicionado de células aviares, medio acondicionado de células de células de levadura, medio acondicionado de células de Tetrahymena, o una combinación de esto. En algunas modalidades, se purifican los trímeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. En otras modalidades, se purifican monómeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. En otras modalidades, se purifican monómeros y trímeros

de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV.

Métodos para Producir Polipéptidos Escindidos de Ecto-Dominio de Proteína F de RSV con Péptidos de Fusión, Alterados

En un aspecto, la invención es un método para preparar una composición que contiene polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un péptido de fusión, alterado. Cuando los polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV que no contienen sitios alterados de escisión con o de furina, se expresan en células hospedadoras, las células hospedadoras procesan los polipéptidos, en parte al escindir el polipéptido en los sitios de furina en aproximadamente las posiciones 109/110 y aproximadamente las posiciones 136/137 para producir subunidades F_1 y F_2. Los polipéptidos procesados se segregan en el cultivo y se pueden recuperar como subunidades F_1-F_2 asociadas (por ejemplo, disulfuro que une la subunidad F_1 y F_2), que pueden formar rosetones de trímeros a través de agregación de péptidos de fusión, expuestos. Los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen péptidos de fusión alterados se pueden producir en y segregar de células hospedadoras como subunidades F_1-F_2 asociadas, y de manera preferente no se agregan en rosetones o con lípidos o contaminantes de lipoproteína. Sin que se desee que se una por alguna teoría particular, se cree que los polipéptidos no

forman rosetones ni se asocian con contaminantes de lípidos y lipoproteínas debido a que el péptido de fusión alterado no media la agregación.

El método de este aspecto de la invención incluye: a) proporcionar un material biológicos que contiene polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contiene un péptido de fusión alterado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión se suprime), tal como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular; y b) purificar polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV del material biológico. Los polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, purificados, se pueden purificar como trímeros escindidos, rosetones de trímeros escindidos, una mezcla de trímeros escindidos y rosetones de trímeros escindidos. Los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, adecuados, que contienen péptidos de fusión alterados contienen sitios de escisión de furina, escindibles en aproximadamente 109/110 y aproximadamente 136/137 y contienen adicionalmente un péptido de fusión alterado como se describe en la presente. Por ejemplo, un polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual se suprimen aproximadamente los aminoácidos 137-152, se suprimen aproximadamente los aminoácidos 137-153, se suprimen aproximadamente los aminoácidos 137-145, se suprimen aproximadamente los aminoácidos 137-146 o se

suprimen aproximadamente los aminoácidos 137-142 se pueden usar en el método. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV; incluyen al menos la supresión 1 de péptido de fusión.

Los polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV (por ejemplo, trímeros escindidos o una mezcla de trímeros escindidos y rosetones de trímeros escindidos), se pueden purificar al grado deseado. En general se prefiere que los polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se purifiquen, por ejemplo, que sean al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o sustancialmente homogéneos. Como se describe en la presente, los polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un polipéptido de fusión alterado se pueden purificar fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaño. Por consiguiente, el método se puede usar para producir fácilmente una composición que contiene trímeros de polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, rosetones de trímeros escindidos, una combinación de trímeros escindidos y rosetones de trímeros escindidos que están sustancialmente libres de lípidos y

lipoproteínas.

Métodos para Producir Polipéptidos de Ecto-Dominio de Proteína F de RSV con Mutaciones de Furina C-terminal

En otro aspecto, la invención es un método para preparar una composición que contiene polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de RSV el método para preparar polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Sin que se desee que se una a alguna teoría particular, se cree que los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se escinden por células que producen las proteínas den el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 109/110, pero no en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, y se segregan en el medio como una subunidad F_1 que está asociada con una subunidad F_2. Además se cree que el péptido de fusión hidrófobo no está expuesto en los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV y, por lo tanto, los polipéptidos no escindidos C-terminales no se asocian con contaminantes de lípidos y lipoproteínas. Como se describe adicionalmente en la presente, los ecto-dominios no escindidos C-terminales de proteína F de RCV se pueden escindir adicionalmente para producir una subunidad F_1, en la cual el término amino es de la posición 110 a aproximadamente la posición 161, que está asociado con una subunidad F_2.

Estas subunidades F_1 y F_2, que se pueden purificar como trímeros, rosetones de trímeros, una mezcla de trímeros y rosetones de trímeros.

En general, la secuencia de aminoácidos de un ecto-dominio no escindido C-termina de proteína F de RSV se altera para impedir la escisión en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de proteasa que se presenta de forma natural o se introduce, que cuando se escinde produce una subunidad F_1, en la cual el término amino es de la posición 110 a aproximadamente la posición 161, y una subunidad F_2. Por ejemplo, el polipéptido no escindido, C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV puede tener una secuencia de aminoácidos que se altera para impedir la escisión en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, pero contiene uno o más sitios de escisión de proteasa que se presentan de forma natural o se introducen de aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161. En un ejemplo particular, la secuencia de aminoácidos de un ecto-dominio no escindido C-terminal de proteína F de RSV se altera para impedir la escisión en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, pero contiene un sitio de escisión de furina que se presenta de forma natural en aproximadamente la posición 109/110.

Una variedad de secuencias de aminoácidos

particulares que permitirán que los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se produzcan y expresen por células hospedadoras, incluyendo secuencias de aminoácidos que no se escinden en los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137, se pueden diseñar y contemplar fácilmente por una persona experta en la técnica. En general, uno o más aminoácidos que son parte de, o que están localizados cerca de, los sitios de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137 se reemplazan o suprimen de forma independiente. Las sustituciones o supresiones adecuadas de aminoácido que impiden la escisión en aproximadamente la posición 136/137 se describen en la presente. Por ejemplo, la sustitución K131Q, la supresión de los aminoácidos en las posiciones 131-134, o las sustituciones K131Q/R133Q/ R135Q/R136Q, cada una de las cuales inhibe la escisión en 136/137, se pueden usar. En ciertas modalidades, los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV comprende al menos una sustitución o supresión de aminoácidos en aproximadamente las posiciones 133-136.

De manera similar, son posibles una variedad de secuencias de aminoácidos particulares de polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV que contiene un sitio de escisión de proteasa (por ejemplo, que se presentan de forma natural o se introduce) que cuando

se escinden producen una primera subunidad que comprende una F_1 y una segunda subunidad que comprende F_2, y se pueden diseñan y contemplar fácilmente. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína F de RSV de aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 161 contiene sitios de escisión de tripsina, y uno o más de los sitios de escisión de tripsina se pueden escindir por tripsina para generar las subunidades F_1 y F_2. Si se desea, se pueden introducir uno o más sitios adecuados de reconocimiento de proteasa en el polipéptido no escindido C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV, por ejemplo, entre aproximadamente las posición 101 a aproximadamente la posición 161. Los sitios de reconocimiento de proteasa, introducidos, se pueden escindir usando la proteasa apropiada para generar subunidades F_1 y F_2. Cuando se introduce un sitio de reconocimiento de proteasa en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido no escindido C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV, se prefiere que el sitio se reconozca por una proteasa que no escinde el ecto-dominio de proteína F de RSV que se presenta de forma natural.

Los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden producir usando cualquier método adecuado. Un método preferido es por expresión recombinante de construcciones que codifican para un ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual se altera esa

secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de furina en aproximadamente las posiciones 136/137, de modo que los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se segreguen por una célula hospedadora que produce los polipéptidos no escindidos en el sitio de escisión de furina en aproximadamente la posición 136/137. De manera preferente, el polipéptido no escindido C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV se segrega por una célula hospedadora que lo produce como una subunidad F_1 que está asociada con una subunidad F_2, en donde el término amino de la subunidad F_1 es de la posición 132 a aproximadamente la posición 161, pero no en la posición 137. Los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden producir usando cualquier célula hospedadora adecuada, como se describe en la presente.

Un método de este aspecto de la invención incluye: a) proporcionar polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV que comprenden un sitio alterado de escisión de furina en la posición 136/137, y los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se segregan de una célula que los produce en la forma de un fragmento F_2 que está asociado con una subunidad que comprende F_1 pero no está escindido en la posición 136/137, y b) escindir los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV,

proporcionados, con una proteasa que escinde el ecto-dominio de proteína F de RSV en un sitio entre las posiciones 101 y 161, produciendo de este modo la composición. En modalidades particulares, el paso b) comprende escindir los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, con una proteasa que escinde el ecto-dominio de proteína F de RSV en un sitio entre aproximadamente las posiciones 101 y 132, o aproximadamente las posiciones 132 y 161, o aproximadamente las posiciones 110 y 132. De manera alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV pueden comprender un sitio alterado de escisión de furina en la posición 136/137, con la condición que el sitio alterado de escisión de furina no sea la supresión de los aminoácidos 131-134. En ejemplos particulares, el material biológico que contiene polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV; incluye al menos el polipéptido de furina N-terminal.

Los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, se pueden purificar al grado deseado. Por ejemplo, los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV proporcionados se pueden proporcionar en un lisado celular, homogenado celular, o medio acondicionado de cultivo celular que está sustancialmente sin procesar (por ejemplo, no

procesado o sólo clarificado), o en una forma parcial o sustancialmente purificada. En ejemplos particulares, los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV proporcionados se proporcionan en medio acondicionado de cultivo celular seleccionado del grupo que consiste de medio acondicionado de células insectiles, medio acondicionado de células mamíferas, medio acondicionado de células aviares, medio acondicionado de células de levadura, medio acondicionado de células de Tetrahymena y combinaciones de esto.

En general se prefiere que los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV proporcionados se purifique, por ejemplo, se purifiquen para que sean al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o sustancialmente homogéneos. Como se describe en la presente, los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar fácilmente de lípidos y lipoproteínas, en tanto que las formas escindidas convencionalmente producidas de proteína F de RSV se co-purifican con contaminantes de lípidos y lipoproteínas. Por consiguiente, cuando se proporcionan polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, purificados, el método se puede usar para producir fácilmente una composición que contiene

ecto-dominios escindidos de proteína F de RSV que están sustancialmente libres de lípidos o fosfolípidos.

Los métodos adecuados para escindir polipéptidos usando una proteasa son bien conocidos y convencionales en la técnica. En general, los polipéptidos que se van a escindir se combinan con una cantidad suficiente de proteasa bajo condiciones (por ejemplo, pH, concentración de polipéptido de proteasa, temperatura) adecuadas para la escisión del polipéptido. Están comercialmente disponibles muchas proteasas adecuadas y las condiciones adecuadas para realizar la escisión de polipéptido son bien conocidas para muchas proteasa. Si se desea, los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar después de la escisión con proteasa.

En un ejemplo del método, se proporcionan polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un péptido intacto de fusión, tal como un polipéptido no escindido C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual se no sustituyen ni suprimen ninguno de los aminoácidos de las posiciones 137-154. En otro ejemplo del método, se proporcionan polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un péptido alterado de fusión, tal como un polipéptido no escindido C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV en el cual se suprimen aproximadamente los

aminoácidos 137-152, aproximadamente los aminoácidos 137-153, aproximadamente los aminoácidos 137-145 o aproximadamente los aminoácidos 137-142. También se han descrito otras supresiones adecuadas de péptido de fusión, tal como la supresión de los aminoácidos en las posiciones 137-146. *Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol*., 85:3677-3687 (2004).

En algunas modalidades, se purifican los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV proporcionados. Se escinden los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV proporcionados, y la escisión da por resultado la formación de trímeros de polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV. Si se desea, los trímeros se pueden purificar adicionalmente usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión de tamaño.

En ejemplos particulares del método, los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV proporcionados contienen al menos el polipéptido de furina en N-terminal (Figura 1). Se escinden los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, proporcionados, por ejemplo con tripsina, y la escisión da por resultado la formación de trímeros escindidos, rosetones de trímeros escindidos, o una combinación de trímeros escindidos y rosetones de trímeros escindidos de polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de

RSV. Si se desea, los trímeros escindidos y rosetones de trímeros escindidos se pueden purificar adicionalmente usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía de exclusión de tamaño.

Otro método de este aspecto de la invención incluye a) proporcionar un material biológico, tal como un lisado celular, homogenado celular o medio acondicionado de cultivo celular, que contiene polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV que comprenden un sitio alterado de escisión de furina en la posición 136/137, y los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV solubles se segregan en una célula que los produce en la forma de un fragmento F_2 que está asociado con una subunidad que comprende F_1 pero no está escindido en la posición 136/137, con la condición que el sitio de escisión de furina alterado no esa la supresión de los aminoácidos 131-134; y b) purificar los polipéptidos no escindidos, C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV del material biológico, produciendo de este modo la composición. De manera preferente, el término amino de la subunidad F_1 es de aproximadamente la posición 110 a aproximadamente la posición 132. De manera más preferente, el término amino de la subunidad F_1 es aproximadamente la posición 110. Es particularmente preferido que el término amino de la subunidad F_1 no sea la posición 137. En ejemplos

particulares, el material biológico que contiene polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, incluye al menos el polipéptido de furina N-terminal.

Si se desea, el polipéptido no escindido, C-terminal de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene además sitios alterados o suprimidos para otras proteasas (por ejemplo, sitios de escisión de tripsina) entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 para impedir la escisión de o con proteasa (por ejemplo, de o con tripsina). Por ejemplo, se suprimen o reemplazan uno o más residuos de lisina y/o arginina (por ejemplo, todos los residuos de lisina y arginina, presentes entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161 con un aminoácidos que no es ni lisina ni arginina, y los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV no se escinden por tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161. Los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV pueden contener un péptido de fusión intacto o un péptido de fusión alterado, como se describe en la presente.

Los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, por ejemplo, monómeros, trímeros y combinaciones de monómeros y trímeros se pueden purificar al grado deseado. En general, se prefiere que los

monómeros o trímeros de polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se purifiquen, por ejemplo, para que sean al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o sustancialmente homogéneos. Como se describe en la presente, los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden purificar fácilmente de lípidos y lipoproteínas, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaño. Por consiguiente, el método se puede usar para producir fácilmente una composición que contiene polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, por ejemplo, monómeros, trímeros, una combinación de monómeros y trímeros, que están sustancialmente libres de lípidos y lipoproteínas. En ejemplos particulares del método, los polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene al menos el polipéptido de furina C-terminal (Figura 1).

En un ejemplo, el método incluye proporcionar medio acondicionado de cultivo de células insectiles, medio acondicionado de cultivo de células mamíferas, medio acondicionado de células aviares, medio acondicionado de células de levadura, medio acondicionado de células de Tetrahymena, o una combinación de estos. En algunas

modalidades, se purifican los trímeros de polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV. En otras modalidades, se purifican monómeros de polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV. En otras modalidades, se purifican monómeros y trímeros de polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV.

ARN Auto-Replicante

Los polipéptidos RSV-F descritos en la presente se pueden producir por expresión de ácidos nucleicos recombinantes que codifican para los polipéptidos en las células de un sujeto. Los ácidos nucleicos preferidos que se pueden administrar a un sujeto para provocar la producción de polipéptidos RSV-F son moléculas de ARN auto-replicantes. Las moléculas de ARN auto-replicantes de la invención se basan en el ARN genómico de virus de ARN, pero carecen de los genes que codifican para una o más proteínas estructurales. Las moléculas de ARN auto-replicantes son capaces de ser traducidas para producir proteínas no estructurales del virus de ARN y proteínas heterólogas codificadas por el ARN auto-replicante.

El ARN auto-replicante contiene en general al menos uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de replicasa viral, proteasas virales, elicasas virales y otras proteínas virales no estructurales, y también comprende

secuencias de replicación cis-activas de 5’-3’-extremo, y si se desea, secuencias heterólogas que codifican para secuencias de aminoácidos deseadas (por ejemplo, una proteína como un antígeno). Un promotor subgenómico que dirige la expresión de la secuencia heteróloga se puede incluir en el ARN auto-replicante. Si se desea, la secuencia heteróloga se puede fusionar en cuadro a otras regiones codificadoras en el ARN auto-replicante y/o puede estar bajo el control de un sitio de entrada a ribosoma internos (IRES, por sus siglas en inglés).

Las moléculas de ARN auto-replicantes de la invención se pueden diseñar de modo que la molécula de ARN auto-replicante no pueda inducir producción de partículas virales infecciosas. Esto se puede lograr, por ejemplo, al omitir uno o más genes virales que codifican para proteínas estructurales que son necesarias para la producción de partículas virales en el ARN auto-replicante. Por ejemplo, cuando la molécula de ARN auto-replicante se basa en un alfa-virus, tal como virus de Sinebis (SIN), virus forestal Semliki y virus de encefalitis equina venezolana virus (VEE), se pueden omitir uno o más genes que codifican para proteínas estructurales virales, tal como capsida y/o glicoproteínas de envoltura, si se desea, las moléculas de ARN auto-replicante de la invención se pueden diseñar para inducir producción de partículas virales infecciosas que están atenuadas o son

virulentas, o para producir partículas virales que son capaces de una ronda individual de infección subsiguiente.

Una molécula de ARN auto-replicante puede, cuando se distribuye una célula vertebrada aún sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN hijos por transcripción de sí mismas (o de una copia antisentido de la misma). El ARN auto-replicante se puede traducir directamente después de la distribución o administración a una célula, y esta traducción proporciona ARN-polimerasa dependiente de ARN que entonces produce transcriptos del ARN administrado. De esta manera, el ARN administrado o distribuido conduce a la producción de múltiples ARN hijos. Estos transcriptos son antisentido con relación al ARN distribuido y se pueden traducir por sí mismos para proporcionar expresión *in situ* de un producto génico, o se pueden transcribir para proporcionar transcriptos adicionales con el mismo sentido con el ARN distribuido que se traducen para proporcionar expresión *in situ* del polipéptido RSV-F codificado.

Un sistema adecuado para lograr la auto-replicación es usar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de hebra positiva se traducen después de la distribución a una célula para dar una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias genómicas de hebra - del ARN

distribuido de hebra +. Estos transcriptos de hebra - se pueden transcribir por sí mismos para da copias adicionales del ARN progenitor de hebra + y también para dar un transcripto subgenómico que codifica para el polipéptido RSV-F. La traducción del transcripto subgenómico conduce de esta manera a la expresión *in situ* del polipéptido RSV-F por la célula infectada. Los replicones adecuados de alfa-virus pueden usar una replicasa de un virus de sindbis, un virus forestal de semliki, un virus de encefalitis equina oriental, un virus de encefalitis equina venezolana, etc.

Una molécula de ARN auto-replicante preferida codifica de esta manera para (i) una ARN-polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN auto-replicante y (ii) un polipéptido RSV-F. La polimerasa puede ser una replicasa de alfa-virus, por ejemplo que comprende proteína nsP4 de alfa-virus.

En tanto que los genomas naturales de alfa-virus codifican para proteínas de viriones estructurales además de la poliproteína de replicasa no estructural, se prefiere que una molécula de ARN auto-replicante basada en alfa-virus, de la invención, no codifique para proteínas estructurales de alfa-virus. De esta manera, el ARN auto-replicante puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no la producción de viriones de alfa-virus que contienen ARN. La incapacidad para producir

estos viriones significa que, diferentes de un alfa-virus tipo silvestre, la molécula de ARN auto-replicante no puede perpetuarse por sí misma en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfa-virus que son necesarias para la perpetuidad en virus tipos silvestres están ausentes de los ARN auto-replicante de la invención y su lugar se toma por genes que codifican para el producto génico deseado, tal que el transcripto subgenómico codifica para el producto génico deseado en lugar de las proteínas de viriones de alfa-virus estructurales.

De esta manera, una molécula de ARN auto-replicante útil con la invención puede tener dos cuadros de lectura abiertos. El primer cuadro de lectura abierto (5’) codifica para una replicada; el segundo cuadro de lectura abierto (3’) codifica para un polipéptido RSV-F. En algunas modalidades el ARN puede tener cuadros de lectura abiertos adicionales (etapa posterior) por ejemplo que codifican para productos génicos adicionales, deseados. Una molécula de ARN auto-replicante puede tener una secuencia 5’ que es compatible con la replicasa codificada.

En un aspecto, la molécula de ARN auto-replicante se deriva de o se basa de un alfa-virus. En otros aspectos, la molécula de ARN auto-replicante se deriva de o se basa en un virus diferente de un alfa-virus, de manera preferente, un virus de ARN de hebra positiva, y de manera más preferente un

picornavirus, flavivirus, rubivirus, pestivirus, hepacivirus, calicivirus, o coronavirus. Las secuencias adecuadas de alfa-virus tipo silvestre son bien conocidas y están disponibles de depositarios de secuencia, tal como la American Type Culture Collection, Rockville, Md. Los ejemplos representativos de alfa-virus adecuados incluyen Aura (ATCC VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), Virus de encefalitis de equina oriental (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), virus Ross River (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Triniti (ATCC VR-469), encefalitis equina venezolana (ATCC VR-374), (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalitis equina oriental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), y Y-62-33 (ATCC VR-375).

El ARN auto-replicante se puede asociar con un sistema de distribución o administración. El ARN auto-replicante se puede administrar con o sin un adyuvante.

Sistema de Distribución de ARN

El ARN auto-replicante de la invención es adecuado para la distribución en una variedad de modalidades, tal como distribución de ARN desnudo o en combinación con lípidos, polímeros u otros compuestos que facilitan la entrada en las células. Las moléculas de ARN auto-replicante de la presente invención se pueden introducir en células objetivo o sujetos usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, por inyección directa, microinyección electroporación, lipofección, biolística, y similares. La molécula de ARN auto-replicante también se puede introducir en células por medio de endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos No. 6,090,619; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 263:14621 (1988); y Curiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 88:8850 (1991). Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6,083,741 describe la introducción de un ácido nucleico exógeno en células mamíferas al asociar el ácido nucleico a una porción de policatión (por ejemplo, poli-L-lisina que tiene 3-100 residuos de lisina), que por sí misma se acopla a una porción que se une a receptor de integrina (por ejemplo, un péptido cíclico que tiene la secuencia Arg-Gly-Asp).

La molécula de ARN auto-replicante de la presente invención se puede distribuir en células mediante amfilos. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,071,890. Típicamente, una molécula

de ácido nucleico puede forrar un complejo con el amfifilo catiónico. Las células mamíferas puestas en contacto con el complejo pueden tomarlo fácilmente.

El ANR auto-replicante se puede distribuir como ANR desnudo (por ejemplo sólo como una solución acuosa de ARN) pero, para mejorar la entrada en células y también efectos intercelulares subsiguiente, el ARN auto-replicante se administra de manera preferente en combinación con un sistema de distribución, tal como un sistema de distribución en partículas o de emulsión. Los expertos en la técnica conocen un gran número de sistemas de distribución. Los sistemas de distribución incluyen, por ejemplo, distribución basada en liposomas (Debs y Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; Rose patente de los Estados Unidos No. 5,279,833; Brigham (1991) WO 91/06309; y Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84: 7413-7414), así como el uso de vectores virales (por ejemplo, adenoviral (Por ejemplo, Berns et al. (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 95-104; Ali et al. (1994) Gene Ther. 1: 367-384; y Haddada et al. (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3): 297-306 para revisión), papilomaviral, retroviral (ver, por ejemplo, Buchscher et al. (1992) J. Virol. 66(5) 2731-2739; Johann et al. (1992) J. Virol. 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., (1990) Virol. 176:58-59; Wilson et al. (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller et al., J. Virol.

65:2220-2224 (1991); Wong-Staal et al., PCT/US94/05700, y Rosenburg y Fauci (1993) in Fundamental Immunology, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., Nueva York y referencias en el mismo y Yu et al., Gene Therapy (1994) supra.), y vectores virales adeno-asociados (ver, West et al. (1987) Virology 160:38-47; Carter et al. (1989) Patente de los Estados Unidos No. 4,797,368; Carter et al. WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invst. 94:1351 y Samulski (supra) para una revisión de vectores AAV; ver también, Lebkowski, patente de los Estados Unidos No. 5,173,414; Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin, et al. (1984) Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081; Hermonat y Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81:6466-6470; McLaughlin et al. (1988) y Samulski et al. (1989) J. Virol., 63:03822-3828), y similares.

Tres sistemas de distribución particularmente útiles son (i) liposomas (ii) micropartículas de polímero no tóxicas y biodegradables (iii) emulsiones de aceite en agua submicrónicas, catiónicas.

Liposomas

Varios lípidos amififílicos pueden formar bicapas en un ambiente acuoso para encapsular un núcleo acuoso que contiene ARN como un liposoma. Estos lípidos pueden tener un grupo cabezal aniónico, catiónico o zwiteriónico hidrófilo.

La formación de liposomas de fosfolípidos aniónicos data de 1960, y se han estudiado lípidos formadores de liposomas catiónicos desde 1990. Estos fosfolípidos son aniónicos en tanto que otros son zwiteriónicos. Las clases adecuadas de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidil etanolaminas, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas y fosfatidilgliceroles, y algunos fosfolípidos útiles se listan en la Tabla 20. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a, dioleoil-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-distearíloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,Ndimetil-3-aminopropano (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLenDMA). Los lípidos zwiteriónicos incluyen, pero no se limitan a, lípidos zwiteriónicos de acilo y lípidos zwiteriónicos de éter, los ejemplos de lípidos zwiteriónicos útiles son DPPC, DOPC y dodecilfosfocolina. Los lípidos pueden estar saturados o insaturados.

Los liposomas se pueden formar de un lípido individual o de una mezcla de lípidos. Una mezcla puede comprender (i) una mezcla de lípidos aniónicos (ii) una mezcla de lípidos catiónicos (iii) una mezcla de lípidos zwiteriónicos, (iv) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos catiónicos, (v) una mezcla de lípidos aniónicos y lípidos zwiteriónicos (vi) una mezcla de lípidos zwiteriónicos y

lípidos catiónicos (vii) una mezcla de lípidos aniónicos, lípidos catiónicos y lípidos zwiteriónicos. De manera similar, una mezcla puede comprender lípidos tanto saturados como insaturados. Por ejemplo, una mezcla puede comprender DSPC (zwiteriónico, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado), y/o DMPG (aniónico, saturado). Donde se usa una mezcla de lípidos, no todos los lípidos componentes en la mezcla necesitan se amfifílicos, por ejemplo, se pueden mezclar con colesterol uno o más lípidos amfifílicos.

La porción hidrófila de un lípido puede estar PEGilada (es decir, modificada por unión covalente de un polietilen-glicol). Esta modificación puede incrementar la estabilidad e impedir la adsorción no específica de los liposomas. Por ejemplo, se pueden conjugar lípidos a PEG usando técnicas tal como aquellas descritas en Heyes et al. (2005) *J Controlled Release* 107:276-287.

Una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMPG y colesterol se usa en los ejemplos. Un aspecto separado de la invención es un liposoma que comprende DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol. Este liposoma encapsula preferentemente ARN, tal como un ARN auto-replicante, por ejemplo que codifica para un inmunógeno.

Los liposomas se dividen usualmente en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas pequeñas unilamelares (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV).

Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimientos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una bicapa individual que encapsula un núcleo acuoso; típicamente las SUV tienen un diámetro ≤50nm, las LUV tienen un diámetro >50nm. Los liposomas útiles con la invención son de forma ideal LUV con un diámetro en el intervalo de 50-220nm. Para una composición que comprende una población de LUV con diferentes diámetros: (i) al menos 80% en número debe tener diámetros en el intervalo de 20-220nm, (ii) el diámetro promedio (Zav, por intensidad) de la población idealmente está en el intervalo de 40-200nm, y/o (iii) los diámetros deben tener un índice de polidispersidad <0.2.

En la técnica son bien conocidas las técnicas para preparar liposomas adecuados, ver, por ejemplo, Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; Liposome Technology, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006; and Functional Polimer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, 25 microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002. Un método útil comprende (i) una solución etanólica de lípidos (ii) una solución acuosa del ácido nucleico y (iii), amortiguador, seguido por mezclado, equilibrio, dilución y purificación (Heyes et al. (2005) J Controlled Release 107:276-87.).

De manera preferente el ARN se encapsula dentro de los liposomas, y de este modo el liposoma forma una capa exterior alrededor de un núcleo acuoso que contiene ARN. Se ha encontrado que esta encapsulación protege el ARN de la digestión con RNasa. Los liposomas pueden incluir algún ARN externo (por ejemplo en la superficie de los liposomas), pero al menos la mitad del ARN (y de manera ideal todo) está encapsulado.

Micropartículas Poliméricas

Varios polímeros pueden formar micropartículas para encapsular o adsorbe el ARN. El uso de un polímero sustancialmente no tóxico significa que un receptor pueda recibir de forma segura las partículas, y el uso de un polímero biodegradable significa que las partículas se pueden metabolizar después de la distribución para evitar persistencia de larga duración. Los polímeros útiles también se pueden esterilizar, para ayudar a preparar formulaciones de grado farmacéutico.

Los polímeros no tóxicos biodegradables adecuados incluyen, pero no se limitan a, poli(α-hidroxi-ácidos), ácidos polihidroxi-butíricos, polilactonas (incluyendo policaprolactonas), polidioxanonas, polivalerolactona, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, policarbonatos derivados de tirosina, polivinilpirrolidinonas o poliéster-amidas, y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, las partículas se forman a partir de poli(α-hidroxi-ácidos), tal como poli(láctidos) (“PLA”), copolímeros de láctido y glicólido tal como poli(D,L-láctido-co-glicólido) (“PLG”), y copolímeros de D,L-lactido y caprolactona. Los polímeros útiles de PLG incluyen aquellos que tienen una relación molar de láctido/glicólido que varía, por ejemplo, de 20:80 a 80:20 por ejemplo 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25. Los polímeros útiles de PLG incluyen aquellos que tienen un peso molecular entre, por ejemplo, 5,000-200,000 Da por ejemplo entre 10,000-100,000, 20,000-70,000, 40,000-50,000 Da.

Las micropartículas tienen de forma ideal un diámetro en el intervalo de 0.02 µm a 8µm. Para una composición que comprende una población de micropartículas con diferentes diámetros al menos 80% en número debe tener diámetros en el intervalo de 0.03-7µm.

En la técnica son bien conocidas las técnicas para preparar micropartículas adecuadas, por ejemplo Functional Polimer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002; Polimers in Drug Delivery. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006. (en particular capítulo 7) y Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996. Para facilitar la adsorción de ARN, una micropartícula puede

incluir un agente tensioactivo catiónico y/o lípido, por ejemplo como se describe en O'Hagan et al. (2001) J Virology75:9037-9043; y Singh et al. (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251. Una manera alternativa para producir micropartículas poliméricas es por moldeo y curación, por ejemplo como se describe en WO2009/132206.

Las micropartículas de la invención pueden tener un potencial zeta de entre 40-100 mV.

El ARN se puede adsorber a las micropartículas, y la adsorción se facilita al incluir materiales catiónicos (por ejemplo lípidos catiónicos) en la micropartícula.

Emulsiones Catiónicas de Aceite en Agua

Se conocen emulsiones de aceite en agua para servir, adyuvante en vacunas de influenza, por ejemplo, el adyuvante MF59^{MR} en el producto FLUAD^{MR}, y el adyuvante AS03 en el producto PREPANDRIX^{MR}. La distribución de ARN de acuerdo a la presente invención puede utilizar una emulsión de aceite en agua, con la condición que la emulsión incluya una o más moléculas catiónicas. Por ejemplo, se puede incluir un lípido catiónico en la emulsión para proporcionar una superficie positiva de gota a la cual puede unirse el ARN negativamente cargado.

La emulsión comprende uno o más aceites. Los aceites adecuados incluyen aquellos de, por ejemplo, una fuente animal (tal como pescado) o una fuente vegetal. El

aceite es idealmente biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuate, aceite de soya, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nuez. Se puede usar aceite de jojoba obtenido por ejemplo de semilla de jojoba. Los aceites de semilla incluyen aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de ajonjolí y similares. En el grupo de granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero el aceite de otros granos cereales tal como trigo, centeno, arroz, teff, triticale similares también se puede usar. Se pueden preparar ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, en tanto que no se presenten de forma natural en los aceites de semilla, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de nuez y semilla. Las grasas y aceites de leche de mamífero son metabolizables y de este modo se pueden usar. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica.

La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y aceite de ballena tal como esperma ejemplifican

varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se refieren en general como terpenoides. También se puede usara ecualano, el análogo saturado de escualeno. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, particularmente en combinación con escualeno. Donde la fase de aceite de una emulsión incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los α, β, γ, δ, ε o ξ-tocoferoles, pero se prefieren α-tocoferoles. Se pueden usar tanto D-α-tocoferol como DL-α-tocoferol. Un α-tocoferol preferido es de DL-α-tocoferol. Se puede usar una combinación de aceite que comprende escualeno y un tocoferol (por ejemplo DL-α-tocoferol).

Las emulsiones preferidas comprenden escualeno, aceite de hígado de tiburón que es un terpenoide insaturado, ramificado ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-]_2$; 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno; CAS RN 7683-64-9).

El aceite en la emulsión puede comprender una combinación de aceites, por ejemplo, escualeno y al menos un aceite adicional.

El componente acuoso de la emulsión puede ser agua simple (por ejemplo w.f.i.) o puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, solutos. Por ejemplo, puede incluir sales para formar un amortiguador por ejemplo sales de citrato o fosfato, tal como sales de sodio. Los amortiguadores típicos incluyen: un amortiguador de fosfato; un amortiguador de Tris; un amortiguador de borato; un amortiguador de succinato; un amortiguador de histidina; o un amortiguador de citrato. Se prefiere una fase acuosa amortiguada, y los amortiguadores se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20mM.

La emulsión también puede incluir un lípido catiónico. De manera preferente, este lípido es un agente tensioactivo de modo que puede facilitar la formación y estabilización de la emulsión. Los lípidos catiónicos útiles contienen en general un átomo de nitrógeno que está cargado positivamente bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, como una amina terciaria o cuaternaria. Este nitrógeno puede estar en el grupo cabezal hidrófilo de un agente tensioactivo anfifílico. Los lípidos catiónicos útiles incluyen, pero no se limitan a: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3’-[N-(N’,N’-Dimetilaminoetano)-carbamoil]Colesterol (DC Colesterol), dimetildioctadecilamonio (DDA por ejemplo el bromuro), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetil-AmonioPropano (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetil-amonio-propano (DPTAP),

distearoiltrimetilamonio-propano (DSTAP). Otros lípidos catiónicos útiles son: cloruro de benzalconio (BAK), cloruro de bencetonio, cetramida (que contiene bromuro de tetradeciltrimetilamonio y posiblemente pequeñas cantidades de bromuro de dedeciltrimetilamonio y bromuro de hexadeciltrimetil-amonio), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de cetil-trimetilamonio (CTAC), N,N',N'-polioxietileno (10)-N-tallow-1,3-diaminopropano, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetil-amonio, bromuro de alquil-trimetil-amonio mezclado, cloruro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecil-amonio, metóxido de benciltrimetilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de dimetildioctadecil-amonio (DDAB), cloruro de metilbenzetonio, cloruro de decametonio, cloruro de trimetil-amonio mezclado con metilo, cloruro de metil-trioctilamonio), cloruro de N,N-dimetil-N-[2(2-metil-4-(1,1,3,3tetrametilbutil)-fenoxi]-etoxi)etil]-benzenemeta-naminio (DEBDA), sales de dialquildimetilamonio, cloruro de [1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N,trimetilamonio, 1,2-diacil-3-(trimetilamonio)-propano (grupo acilo =Dimiristoil, dipalmitoilo, distearoilo, dioleoilo), 1,2-diacil-3-(dimetilamonio)propano (grupo acilo=dimiristoil, dipalmitoilo, distearoilo, dioleoilo), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amonio)butanoil-sn-glicerol, éster de 1,2-dioleoil-

3-succinil-sn-glicerol-colina, colesteril-(4'-trimetilamonio) butanoato), sales de N-alquil-piridinio (por ejemplo bromuro de cetilpiridinio y cloruro de cetilpiridinio), sales de N-alquilpiperidinio, electrolitos de bolaform dicatiónicos (C12Me6; C12BU6), dialquilglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L-α dioleoilfosfatidiletanolamina, éster de colina de hemisuccinato de colesterol, lipopoliaminas, incluyendo pero no limitado a dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS), dipalmitoil-fosfatidiletanolamidoespermina (DPPES), lipopoli-L (o D)-lisina (LPLL, LPDL), poli (L (o D)-lisina conjugada N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster didodecil-glutamato con grupo amino colgante (C^GluPhCnN), éster de ditetradecil-glutamato con grupo amino colgante (Cl4GIuCnN+), derivados catiónicos de colesterol, incluyendo, pero no limitado a sal de colesteril-3-β-oxisuccinamidoetilentrimetilamonio, colesteril-3-β-oxisuccinamidoetilen-dimetilamina, sal de colesteril-3-β-carboxiamidoetilentrimetilamonio, y colesteril-3-β-carboxiamidoetilendimetilamina. Otros lípidos catiónicos útiles se describen en US 2008/0085870 y US 2008/0057080, que se incorporan en la presente como referencia.

El lípido catiónico es preferentemente biodegradable (metabolizable) y biocompatible.

Además del aceite y lípido catiónico, una emulsión puede incluir un agente tensioactivo no iónico y/o un agente

tensioactivo zwiteriónico. Estos agentes tensioactivos incluyen, pero no se limitan a: los agentes tensioactivos de ésteres de polioxietileno-sorbitan (referidos comúnmente como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo en nombre comercial DOWFAX^{MR}, tal como copolímeros de bloque de EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanediilo) repetitivos, con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) que son de interés particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocido como agentes tensioactivos Brij), tal como éter monolaurílico de trietileneglicol (Brij 30); polioxietilen-9-lauriléter; y ésteres de sorbitan (conocidos comúnmente como los Spans), tal como trioleato de sorbitan (Span 85) y monolaurato de sorbitan. Los agentes tensioactivos preferidos para la inclusión en la emulsión son polisorbato 80 (Tween 80; monooleato de polioxietilen-sorbitan), Span 85 (trioleato de sorbitan), lecitina y Triton X-100.

Se pueden incluir mezclas de estos agentes tensioactivos en la emulsión, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85, o mezclas de Tween 80/Triton-X100. Una

combinación de un éster de polioxietilen-sorbitan tal como monooleato de polioxietilen-sorbitan (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100) también es adecuada. Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilen-sorbitan y/o un octoxinol. Las mezclas útiles pueden comprender un agente tensioactivo con un valor HLB en el intervalo de 10-20 (por ejemplo polisorbato 80, con un HLB de 15.0) y un agente tensioactivo con un valor de HLB en el intervalo de 1-10 (por ejemplo trioleato de sorbitan, con un HLB de 1.8).

Las cantidades preferidas de aceite (% en volumen) en la emulsión final están entre 2-20%, por ejemplo 5-15%, 6-14%, 7-13%, 8-12%. Es particularmente útil un contenido de escualeno de aproximadamente 4-6% o aproximadamente 9-11%.

Las cantidades preferidas de agentes tensioactivos (% en peso) en la emulsión final están entre 0.001% y 8%. Por ejemplo: ésteres de polioxietileno-sorbitan (tal como polisorbato 80) de 0.2 a 4%, en particular entre 0.4-0.6%, entre 0.45-0.55%, aproximadamente 0.5% o entre 1.5-2%, entre 1.8-2.2%, entre 1.9-2.1%, aproximadamente 2%, o 0.85-0.95%, o aproximadamente 1%; ésteres de sorbitan (tal como trioleato de sorbitan) 0.02 a 2%, en particular aproximadamente 0.5% o aproximadamente 1%; octil- o nonilfenoxi-polioxietanoles (tal como Triton X-100) 0.001 a 0.1%, en particular 0.005 a 0.02%; polioxietilen-éteres (tal como laureth 9) de 0.1 a 8%, de

manera preferente de 0.1 a 10% y en particular 0.1 a 1% o aproximadamente 0.5%.

Las cantidades absolutas de aceite y agente tensioactivo, y su relación, se puede variar dentro de límites amplios en tanto que aún formen una emulsión. Una persona experta puede variar fácilmente las proporciones relativas de los componentes para obtener una emulsión deseada, pero es típica una relación en peso de entre 4:1 y 5:1 para aceite y agente tensioactivo (aceite den exceso).

Un parámetro importante para asegurar la actividad inmunoestimuladora de una emulsión, en particular en animales grandes, es el tamaño de gota de aceite (diámetro). Las emulsiones más efectivas tienen un tamaño de gota en el intervalo de submicrones. De manera adecuada, los tamaños de gota estarán en el intervalo de 50-750 nm. De manera más útil, el tamaño promedio de gota es menos de 250nm por ejemplo menos de 200nm, menos de 150nm. El tamaño promedio de gota está de forma útil en el intervalo de 80-180nm. Idealmente, al menos 80% (en número) de las gotas de aceite de la emulsión son de menos de 250 nm de diámetro, y de manera preferente al menos 90%. Los aparatos para determinar el tamaño promedio de gota en una emulsión, y la distribución de tamaños, están comercialmente disponibles. Estos usan típicamente las técnicas de dispersión dinámica de luz y/o percepción óptica de partículas individuales, por ejemplo, la

serie de instrumentos Accusizer^{MR} y Nicomp^{MR} disponibles de Particle Sizing Systems (Santa Barbara, EUA), o los instrumentos Zetasizer^{MR} de Malvern Instruments (RU), o instrumentos Particle Size Distribution Analyzer de Horiba (Kyoto, Japón).

De manera ideal, la distribución de los tamaños de gota (por número) tiene solo un máximo, es decir hay una población individual de gotas distribuidas alrededor de un promedio (modo), en lugar de tener dos máximos. Las emulsiones preferidas tienen una polidispersidad de <0.4 por ejemplo 0.3, 0.2, o menos.

Las emulsiones adecuadas con gotas de submicrones y una distribución estrecha de tamaños se pueden obtener por el uso de microfluidisación. Esta técnica reduce el tamaño promedio de gota de aceite al propulsar corrientes de componentes de entrada a través de canales geométricamente fijados a alta presión y alta velocidad. Estas corrientes se ponen en contacto con las paredes de los canales, las paredes de las cámaras y entre sí. Las fuerzas de corte, de impacto y de cavitación resultantes provocan una reducción en el tamaño de gota. Los pasos repetitivos de la microfluidización se pueden realizar hasta que se logre una emulsión con un promedio deseado de tamaño de gota y una distribución deseada de tamaño de gota.

Como una alternativa a la microfluidización, se

pueden usar métodos térmicos para provocar inversión de fase. Estos métodos también pueden proporcionar una emulsión de submicrones con una distribución estrecha de tamaño de partículas.

Las emulsiones preferidas se pueden esterilizar por filtro, es decir, sus gotas pueden pasar a través de un filtro de 220nm. Así como se proporciona una esterilización, este procedimiento también remueve cualquier gota grande en la emulsión.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico en la emulsión es DOTAP. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml de DOTAP. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DOTAP de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0.6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0.7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0.8 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0.9 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.2 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.3 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.4 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de

aproximadamente 1.6 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 1.7 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 24 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 22 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 18 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 1.9 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 1.8 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 1.7 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 1.6 mg/ml, de aproximadamente 0.6 mg/ml a aproximadamente 1.6 mg/ml, de aproximadamente 0.7 mg/ml a aproximadamente 1.6 mg/ml, de aproximadamente 0.8 mg/ml a aproximadamente 1.6 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml, a aproximadamente 0.6 mg/ml, aproximadamente 0.7 mg/ml, a aproximadamente 0.8 mg/ml, aproximadamente 0.9 mg/ml, aproximadamente 1.0 mg/ml, aproximadamente 1.1 mg/ml, aproximadamente 1.2 mg/ml, aproximadamente 1.3 mg/ml, aproximadamente 1.4 mg/ml, aproximadamente 1.5 mg/ml, aproximadamente 1.6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml,

aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21.8 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, etc. En una modalidad de ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende de aproximadamente 0.8 mg/ml a aproximadamente 1.6 mg/ml de DOTAP, tal como 0.8 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.4 mg/ml o 1.6 mg/ml.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico es Colesterol de DC. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender Colesterol DC de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de Colesterol DC. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender Colesterol DC de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.62 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2.46 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de

aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 4.92 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 4.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 3.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 2.46 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 1.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 0.62 mg/ml, aproximadamente 0.15 mg/ml, aproximadamente 0.3 mg/ml, aproximadamente 0.6 mg/ml, aproximadamente 0.62 mg/ml, aproximadamente 0.9 mg/ml, aproximadamente 1.2 mg/ml, aproximadamente 2.46 mg/ml, aproximadamente 4.92 mg/ml, etc. En una modalidad de ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende de aproximadamente 0.62 mg/ml a aproximadamente 4.92 mg/ml de Colesterol DC, tal como 2.46 mg/ml.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico es DDA. La emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de DDA. Por ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica puede comprender DDA de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 4.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 4

mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 3.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 2.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 1.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 1.45 mg/ml, de aproximadamente 0.2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.6 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.73 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.8 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 0.9 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1.2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 1.45 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 3.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 4.5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 1.2 mg/ml, aproximadamente 1.45 mg/ml, etc. De manera alternativa, la emulsión de aceite en agua

catiónica puede comprende de DDA a aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 21.5 mg/ml, aproximadamente 21.6 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml. En una modalidad de ejemplo, la emulsión de aceite en agua catiónica comprende de aproximadamente 0.73 5 mg/ml a aproximadamente 1.45 mg/ml de DDA, tal como 1.45 mg/ml.

Se pueden usar catéteres o dispositivos similares para distribuir las moléculas de ARN auto-replicantes de la invención, como ARN desnudo o en combinación con un sistema de distribución, a un órgano o tejido objetivo o diana. Los catéteres adecuados se describen por ejemplo en la patente de los Estados Unidos Nos. 4,186,745; 5,397,307; 5,547,472; 5,674,192; y 6,129,705, todas las cuales se incorporan en la presente como referencia.

La presente invención incluye el uso de sistemas de distribución adecuados, tal como liposomas, micropartículas de polímero o micropartículas de emulsión de submicrones con ARN auto-replicante encapsulado o adsorbido, para distribuir una molécula de ARN auto-replicante que codifica para un polipéptido RSV-F, por ejemplo, para producir una respuesta inmunitaria sola, o en combinación con otra macromolécula. La invención incluye liposomas, micropartículas y emulsiones de submicrones con moléculas de ARN auto-replicante adsorbidas y/o encapsuladas y combinaciones de esto.

Como se demuestra adicionalmente en los ejemplos,

las moléculas de ARN auto-replicantes asociadas con liposomas y micropartículas de emulsión de submicrones se pueden administrar de manera efectiva a la célula hospedadora, y pueden inducir una respuesta inmunitaria a la proteína codificada por el ARN auto-replicante.

La composición inmunogénica

La invención proporciona composiciones inmunogénicas. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir un agente inmunogénico activo individual, o varios agentes inmunogénicos. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede comprender polipéptidos F de RSV que están en una forma individual (por ejemplo, monómero, trímero, o rosetones) o en dos o más formas (por ejemplo, una mezcla de monómero y trímero o un equilibrio dinámico entre monómero y trímero). La composición inmunogénica puede comprender un ARN auto-replicante que codifica para un polipéptido RSV-F, y de manera preferente también comprende un sistema de distribución adecuado, tal como liposomas, micropartículas poliméricas, una emulsión de aceite en agua y combinaciones de esto.

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunoreguladores. De manera preferente, uno o más de los agentes inmunoreguladores incluyen uno más adyuvantes, por ejemplo dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Los adyuvantes

pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2, analizado adicionalmente más adelante.

En otra modalidad, una composición inmunogénica de la invención comprende un polipéptido que exhibe un epítopo presente en una conformación de pre-fusión o intermedia de la glicoproteína RSV-F, pero no exhibe la conformación de pos-fusión de la glicoproteína.

En otra modalidad, una composición inmunogénica de la invención comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una proteína F de RSV, en totalidad o en parte, y el segundo polipéptido comprende un dominio heterólogo de oligomerización. El primer polipéptido puede comprender un ectodominio de proteína F de RSV. El segundo polipéptido puede ser un dominio de trimerización de hemaglutinina de influenza, un dominio de trimerización de espiga de SARS, un dominio de trimerización de gp41 de VIH, NadA, GCN4 modificado, o ATCasa.

En un aspecto, la invención es una composición que comprende polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV producidos al proporcionar polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, o polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, y escindirlos para producir subunidades F_1 y F_2, como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende trímeros y/o monómeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV producidos al proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV y purificar monómeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, trímeros no escindidos, o una combinación de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos (por ejemplo, un mezcla o un equilibrio dinámico) del material biológico, como se describe en la presente. En algunas modalidades, el polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV contiene sitios alterados de escisión de furina en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136, y si se desea puede contener además un polipéptido de fusión, alterado. En otras modalidades, el ecto-dominio de proteína F de RSV contiene sitios alterados de escisión de furina en aproximadamente las posiciones 106-109 y en aproximadamente las posiciones 133-136, y sitios alterados de escisión de tripsina entre aproximadamente la posición 101 y aproximadamente la posición 161, y si se desea puede contener además un péptido de fusión, alterado.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende trímeros y/o monómeros de polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV,

producidos al proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos C-terminales de ecto-dominio de proteína F de RSV, y purificar monómeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, trímeros no escindidos, una combinación de monómeros no escindidos y trímeros no escindidos (por ejemplo, una mezcla o un equilibrio dinámico) del material biológico, como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV producidos al proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contiene un péptido de fusión alterado (por ejemplo, al menos una porción del polipéptido de fusión se suprime) y purificar trímeros de polipéptidos escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV del material biológico, como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención es una composición que comprende polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV producidos al proporcionar un material biológico que contiene polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV que contienen un péptido de fusión alterado (por ejemplo, al menos una porción del péptido de fusión se suprima) y purificar monómeros de polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de

RSV del material biológico, como se describe en la presente.

Las composiciones de la invención son preferentemente adecuadas para la administración a un sujeto mamífero, tal como un humano, e incluyen uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo adyuvantes. Un análisis completo de los componentes está disponible en la preferencia 29. Las composiciones en general estarán en una forma acuosa. Cuando la composición es una composición inmunogénica, producirá una respuesta inmunitaria cuando se administre a un mamífero, tal como un humano. La composición inmunogénica se puede usar para preparar una formulación de vacuna para inmunizar un mamífero.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir un agente inmunogénicos, activo, individual o varios agentes inmunogénicos. Por ejemplo, el polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV puede estar en una forma individual (por ejemplo, un monómero no escindido, monómero escindido, trímero no escindido, trímero escindido, o rosetones de trímeros escindidos) o en dos o más formas (por ejemplo, una mezcla de monómero no escindido y trímero no escindido o un equilibrio dinámico entre monómero no escindido y trímero no escindido). Además, las composiciones pueden contener un polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV y una o más proteínas RSV diferentes (por ejemplo, una proteína G y/o una proteína M) y/o se pueden combinar con inmunógenos de otro

patógenos.

La composición puede incluir conservadores tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo se prefiere que la vacuna deba estar sustancialmente libre de (es decir, menos de 5µg/ml) material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal. Las composiciones inmunogénicas que no contienen mercurio son más preferidas. Son particularmente preferidas las composiciones inmunogénicas libres de conservador.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal sódica. Se prefiere cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente de entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, fosfato diácido de potasio, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y similares.

Las composiciones tendrán en general una osmolaridad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, de manera preferente entre 240-360 mOsm/kg, y caerán de manera preferente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más amortiguadores. Los amortiguadores típicos incluyen: un amortiguador de fosfato, un amortiguador de Tris; un amortiguador de borato; o un amortiguador de succinato; un amortiguador de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un amortiguador de citrato. Los

amortiguadores se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20mM. El pH de una composición estará en general entre 5.0 y 8.1, y más típicamente entre 6.0 y 8.0, por ejemplo, entre 6.5 y 7.5, o entre 7.0 y 7.8. Un proceso de la invención puede incluir por lo tanto un paso para justar el pH de la vacuna volumétrica antes del envasado.

La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirogénica, por ejemplo, que contiene <1 EU (unidad de endotoxina, una medida normal) por dosis, y de manera preferente <0.1 por EU por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten. Las vacunas humanas se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0.5ml, aunque a niños se puede administrar una media dosis (es decir, aproximadamente 0.25ml).

Adyuvantes

Las composiciones de la invención, que contienen polipéptidos RSV-F, o ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos RSV-F, también pueden contener uno o más adyuvantes, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más adyuvantes, que pueden funcionar para mejorar las respuestas inmunitarias (humoral y/o celular) producidas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante TH1 y/o un adyuvante TH2. Los adyuvantes que se pueden usar en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Composiciones que contienen minerales. Las composiciones que contienen minerales adecuadas para el uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tal como sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de estas). La invención incluye sales minerales tal como hidróxido (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc., o mezclas de diferentes compuestos minerales, con el compuesto que toma cualquier forma adecuada (por ejemplo gel, cristalina, amorfa, etc.), y con adsorción que se prefiere. Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas “CAP” descritas en la referencia 38). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, y similares. Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular como una partícula de sal metálica (39). Se describen en más detalle más adelante adyuvantes de sales de aluminio.

- Composiciones de emulsión de aceite (ver en más detalles más adelante). Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para el uso como adyuvantes de la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tal como MF59 (5% de Escualeno, 0.5% de Tween 80 y 0.5% de Span, formulados en partículas de submicrones usando un microfluidizador).

- Agentes que inducen citocinas (ver en más detalle más adelante). Los agentes que inducen citocina adecuados

para el uso en la invención incluyen agonistas del receptor 7 tipo Toll (TLR7) (por ejemplo compuestos de benzonaftiridina descritos en WO 2009/111337.

- Saponinas (capítulo 22 de referencia 74), que son un grupo heterólogo de esterol-glicósidos y glicósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces y aún flores de una amplia variedad de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol de molina *Quillaia saponaria* se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (sarsaprilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officianalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tal como QS21, así como formulaciones de lípidos, tal como ISCOMs. QS21 se comercializa como STIMULON^{MR}. Se ha purificado composiciones de saponina usando HPLC y RP-HPLC. Las fracciones purificadas específicas usando estas técnicas se han identificado, que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. De manera preferente, la saponina es QS21. Un método para la producción de QS21 se describe en la referencia 40. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol (41). Las combinaciones de saponinas y colesteroles se pueden usar para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM) (capítulo 23

de referencia. 74). Los SCOM incluyen también típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en los ISCOM. De manera preferente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las referencias 41-43. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional (44). Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las referencias 45 y46.

- Adyuvantes grasos (ver en más detalle más adelante), que incluyen emulsiones de aceite en agua, lípido natural modificado como se deriva de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos de fosfolípido (tal como el dímero de fosfolípido sintético, E6020) y similares.

- Toxinas ADP-ribosilantes bacterianas (por ejemplo, la enterotoxina térmicamente lábil “LT” de *E. coli*, la toxina de cólera “CT”, o toxina de pertussis “PT”) y derivados destoxificados de las mismas, tal como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 (47). El uso de toxinas ADP-ribosilantes destoxificadas adyuvantes mucosos se describe en la referencia 48 y como adyuvantes parenterales en la referencia 49.

- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tal como microesferas (50) de ácido hialurónico esterificado o quitosan y sus derivados (51).

- Micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, de manera más preferente de ~200 nm a ~30 µm de diámetro, o ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, a poli(α-hidroxi-ácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, y similares), con poli(láctido-co-glicólido) que es el preferido, opcionalmente tratado para obtener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

- Liposomas (Capítulos 13 y 14 de referencia 74). Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para el uso como adyuvantes se describen en la referencia 52-54.

-Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (55). Estas formulaciones incluyen además agentes tensioactivos de éster de polioxietilen-sorbitan en combinación con octoxinol (56) así como agentes tensioactivos de éteres o ésteres de polioxietilen-alquilo en combinación con al menos un agente tensioactivo no iónico adicional tal como octoxinol (57). Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril-éter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoril-éter, polioxiteilen-8-esteoril-éter, polioxietilen-4-lauril-éter, polioxietilen-35-lauril-éter, y polioxietilen-23-lauril-éter.

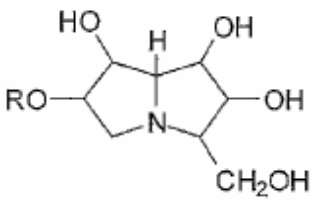
- Péptidos de muramilo, tal como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (“thr-MDP”), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (no-MDP), N-acetilglucsaminil-N-acetilmuramyl-L-A1-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi-propilamida (“DTP-DPP”, o “Theramide^{MR}”), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1’-2’dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (“MTP-PE”).

- Una preparación de proteosoma de proteína de membrana exterior preparada de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacáridos derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en donde las preparaciones de liposacárido y proteosoma de proteína de membrana exterior forman un complejo adyuvante, no complejo estable. Estos complejos incluyen “IVX-908”, un complejo comprendido de membrana exterior de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos.

- Un polímero de polioxidonio (58, 59) u otro derivado de polietileno-piperazina N-oxidado.

- Metil-inosina-5’-monofosfato (“MIMP”) (60).

- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado (61), tal como uno que tiene la formula:



donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo y arilo rectos o ramificados, insustituidos o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado del mismo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6-α-D-glucopiranosa, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, y similares.

- Un ligando CD1d, tal como una α-glicosilceramida (62-69) (por ejemplo, α-galactosilceramida), α-glicosilceramidas que contiene fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanetriol], CRONY-101, 3’’-O-sulfo-galactosilceramida, etc.

- Una gamma-inulina (70) o derivado de la misma, tal como algamulina.

- Virosomas y partículas tipo virus (VLP). Estas estructuras contienen en general una o más proteínas de un virus, opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. En general no son patógenas, no replicantes y en general no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales se pueden producir de forma recombinante o aislar de virus enteros. Estas proteínas virales adecuadas para el uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus de influenza (tal como HA o NA), virus de Hepatitis

B (tal como proteínas de núcleo o capsida), virus de Hepatitis E, virus de sarampión, virus de Sindbis, Rotavirus, virus de enfermedad de pies y boca, Retrovirus, virus de Norwalk, virus de papiloma humano, VIH, ARN-fagos, Qß-fago (tal como proteínas de revestimiento), GA-fago, fr-fago, AP205-fago, y Ty (tal como proteína 1 de Ty de retrotransposon).

Estas y otras sustancias activas de adyuvante se analizan en más detalle en las referencias 74 y 75.

Las composiciones pueden incluir dos, tres, cuatro o más adyuvantes. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden incluir de manera ventajosa tanto una emulsión de aceite en agua como un agente inductor de citocinas o tanto una composición que contiene minerales y un agente inductor de citocinas, o dos adyuvantes de emulsión de aceite en agua, o dos compuestos de benzonaftiridina, etc.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán típicamente en mezcla.

Adyuvantes de emulsión de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para el uso como adyuvante en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tal como MF59 (5% de escualeno, 0.5% de Tween 80, y 0.5% de Span 85, formulados en partículas de submicrones usando un microfluidizador). También se puede usar el adyuvante completo de Freund (CFA, por sus siglas en

inglés) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés).

Se conocen varias emulsiones de aceite en agua, e incluyen típicamente al menos un aceite y al menos un agente tensioactivo, con los aceites y agentes tensioactivos que son biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión son en general de menos de 5 μm de diámetro, y pueden tener aun un diámetro de sub-micrones, con estos pequeños tamaños que se logran con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotas con un tamaño menor de 200 nm puesto que se pueden someter a esterilización por filtro.

La invención se puede usar con aceites tal como aquellos de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuate, aceite de soya, aceite de coco, y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de nuez. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semilla incluyen aceite de cártamo, aceite de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de ajonjolí y similares. En el grupo de granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos seriales tal como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Se pueden

preparar ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, en tanto que no se presenten de forma natural en los aceites de semilla, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de nuez y semilla. Las grasas y aceites de leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y aceite de ballena tal como esperma ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan de forma bioquímica en unidades de isopreno de 5-carbonos y se refieren en general como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado, ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en la presente. También es un aceite preferido el escualano, el análogo saturado de escualeno. Los aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos en la

técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (ver más adelante). Se pueden usar mezclas de aceites.

Los agentes tensioactivos se pueden clasificar por su “HLB” (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los agentes tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, de manera preferente al menos 15, y de manera más preferente al menos 16. La invención se puede usar con agentes tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los agentes tensioactivos de ésteres de polioxietileno-sorbitan (comúnmente referidos como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX^{MR}, tal como copolímeros de bloque de EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) repetitivos, con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) que es de interés particular;; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tal como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tal como la serie TERGITOL^{MR} NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como agentes tensioactivos Brij), tal como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitan (comúnmente conocidos como Span), tal como trioleato de sorbitan (Span 85) y monolaurato de

sorbitan. Se prefieren agentes tensioactivos no iónicos. Los agentes tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son TWEEN 80^{MR} (monooleato de polioxietilen-sorbitan), Span 85 (trioleato de sorbitan), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar mezclas de agentes tensioactivos, por ejemplo, mezclas de TWEEN 80^{MR}/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilen-sorbitan tal como monooleato de polioxietilen-sorbitan (TWEEN 80^{MR}) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilen-sorbitan y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de agentes tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilen-sorbitan (tal como (TWEEN 80^{MR})) de 0.01 a 1 %, en particular aproximadamente 0.1 %; octil-o nonilfenoxi-polioxietanoles (tal como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) de 0.001 a 0.1 %, en particular 0.005 a 0.02 %; éteres de polioxietileno (tal como laureth 9) de 0.1 a 20 %, de manera preferente de 0.1 a 10 % y en particular de 0.1 a 1 % o aproximadamente 0.5 %.

Los adyuvantes específicos de emulsión de aceite en agua útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión de submicrones de escualeno, TWEEN 80^{MR}, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente

0.5 % de polisorbato 80, y aproximadamente 0.5 % de Span 85. En términos de peso, estas relaciones llegan a ser 4.3 % de escualeno, 0.5 % de polisorbato 80 y 0.48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como “MF59” (71-73), como se describe en más detalle en el capítulo 10 de la referencia 74 y capítulo 12 de la referencia 75. La emulsión MF59 incluye de manera ventajosa iones de citrato, por ejemplo, amortiguador de citrato 10mM.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y TWEEN 80^{MR}. La emulsión puede incluir solución salina amortiguada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0.3 a 3 % de TWEEN 80^{MR}, y la relación en peso de escualeno: tocoferol es de manera preferente <1 puesto que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y TWEEN 80^{MR} pueden presentar una relación en volumen de aproximadamente 5:2. Esta emulsión se puede hacer al disolver TWEEN 80^{MR} en PBS para dar una solución al 2 %, luego mezclar 90 ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL-α-tocoferol y 5ml de escualeno), luego microfluidizar la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite de submicrones, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250nm, de manera preferente de aproximadamente 180nm.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un

detergente Triton (por ejemplo Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (ver más adelante). La emulsión puede contener un amortiguador de fosfato.

- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (un succinato de α-tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo 750 μg/ml de polisorbato 80, 110 μg/ml de Triton X-100 y 100 μg/ml de succinato de α-tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (ver más adelante). La fase acuosa puede contener un amortiguador de fosfato.

- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("PLURONIC^{MR} L121"). La emulsión se puede formular en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7.4. Esta emulsión es un vehículo de distribución útil para dipéptidos de muramilo, y se ha usado como treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (76) (0.05-1 % de Thr-MDP, 5 % escualano, 2.5 % de Pluronic L121 y 0.2 % de polisorbato 80). También se puede usgar sin el Thr-MDP, como el adyuvante "AF" (77) (5 % de escualano, 1.25 % de Pluronic L121 y 0.2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

- Una emulsión que comprende escualeno, un solvente

acuoso, un agente tensioactivo no iónico hidrófilo de éter alquílico de polioxietileno (por ejemplo éter cetoestearílico de polioxietileno (12)) y un agente tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo un éster de sorbitan o éster de manida, tal como monooleato de sorbitan o “Span 80”). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos 90 % de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño menor de 200 nm. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. Estas emulsiones se pueden liofilizar.

- Una emulsión que tiene de 0.5-50 % de un aceite, 0.1-10 % de un fosfolípido, y 0.05-5 % de un agente tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 78, los componentes de fosfolípido preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gota de submicrones son ventajosos.

- Una emulsión de aceite en agua de submicrones de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un agente tensioactivo (tal como lecitina, TWEEN 80^{MR} o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tal como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 79, producido por

adición de amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetiidioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil)propanodiamina.

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un agente tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno).

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un agente tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno).

- Una emulsión en la cual una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo, un colesterol) se asocian como micelas helicoidales (80).

Las emulsiones se pueden mezclar con antígeno de forma extemporánea, en el momento de la distribución. De esta manera, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener de forma separada en una vacuna envasada o distribuida, lista para formulación final en el momento del uso. El antígeno estará en general en una forma acuosa, tal que la vacuna se prepare finalmente al mezclar dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos para mezclado puede variar (por

ejemplo entre 5:1 y 1:5) pero en general es de aproximadamente 1:1.

Agentes Inductores de Citocina

Los agentes inductores de citocinas para la inclusión de las composiciones de la invención son capaces, cuando se administran a un paciente, de hacer que el sistema inmunitario libere citocinas, incluyendo interferones e interleucinas. Los agentes preferidos pueden producir la liberación de uno o más de: interferón-γ; interleucina-1; interleucina-2; interleucina-12; TNF-α; TNF-β; y GM-CSF. Los agentes preferidos producen la liberación de citocinas asociadas con respuesta inmunitaria tipo Th1, por ejemplo, interferón-γ, TNF-α, interleucina-2. Se prefiere la estimulación tanto de interferón-γ e interleucina-2.

Como resultado de recibir una composición de la invención, por lo tanto, un paciente tendrá células T que, cuando se estimulan con una proteína F de RSV, liberarán las citocinas deseadas de una manera específica del antígeno. Por ejemplo, las células T purificadas de su sangre liberaran γ-interferón cuando se exponen *in vitro* a proteína F. Los métodos para medir estas respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se conocen en la técnica, e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR de tiempo real. Por ejemplo, la referencia 81 reporta un estudio en el cual se

monitorizaron respuestas inmunitarias mediadas por células T específicas del antígeno contra toxoide de tétanos, específicamente respuestas a γ-interferón, y se encontró que ELISPOT fue el método más sensible para discriminar respuestas inducidas por TT específicas de antígeno de respuestas espontáneas, pero que la detección de citocinas intracitoplásmicas por citometría de flujo fue el método más eficiente para detectar efectos re-estimuladores.

Los agentes adecuados inductores de citocinas incluye, pero no se limitan a:

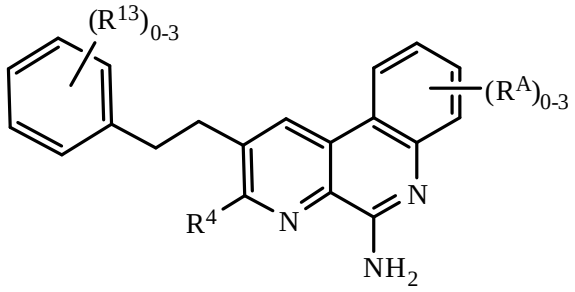
- Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citocina no metilada enlazada por un enlace de fosfato a una guanosina), o un ARN de doble hebra, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia de poli(dG).

- monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (“3dMPL”, también conocido como “MPL^{MR}”) (82-85).

- Un compuesto de imidazoquinolina tal como IMIQUIMOD^{MR} (“R-837”) (86, 87), RESIQUIMOD^{MR} (“R-848”) (88), y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Los detalles adicionales a cerca de las imidazoquinolinas inmunoestimuladoras se pueden encontrar en las referencias 89 a 93.

- Un compuesto de benzonaftiridina, tal como:

(a) un compuesto que tiene la fórmula:



en donde:

R^4 se selecciona de H, halógeno, -C(O)OR^7, -C(O)R^7, -C(O)N($R^{11}R^{12}$), -N($R^{11}R^{12}$), -N(R^9)$_2$, -NHN(R^9)$_2$, -SR^7, -(CH_2)$_n$OR^7, -(CH_2)$_n$$R^7$, -L$R^8$, -L$R^{10}$, -OL$R^8$, -OL$R^{10}$, C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde los grupos C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo de R^4 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, –CN, -NO_2, -R^7, -OR^8, -C(O)R^8, -OC(O)R^8, -C(O)OR^8, -N(R^9)$_2$, -P(O)(OR^8)$_2$, -OP(O)(OR^8)$_2$, -P(O)(OR^{10})$_2$, -OP(O)(OR^{10})$_2$, -C(O)N(R^9)$_2$, –S(O)$_2$$R^8$, –S(O)$R^8$, –S(O)$_2$N($R^9$)$_2$, y -N$R^9$S(O)$_2$$R^8$;

cada L se selecciona independientemente de un enlace, -(O(CH_2)$_m$)$_t$-, C_1-C_6alquilo, C_2-C_6alquenileno y C_2-C_6alquinileno, en donde los C_1-C_6alquilo, C_2-C_6alquenileno y

C_2-C_6alquinileno de L están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -R^8, -OR^8, -$N(R^9)_2$, -$P(O)(OR^8)_2$, -$OP(O)(OR^8)_2$, -$P(O)(OR^{10})_2$, y -$OP(O)(OR^{10})_2$;

R^7 se selecciona de H, C_1-C_6alquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, y C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde los grupos C_1-C_6alquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, y C_3-C_8heterocicloalquilo de R^7 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos R^{13}; cada R^8 se selecciona independientemente de H, -$CH(R^{10})_2$, C_1-C_8alquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6haloalquilo, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6heteroalquilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_2-C_8heterocicloalquilo, C_1-C_6hidroxialquilo y C_1-C_6haloalcoxi, en donde los grupos C_1-C_8alquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_1-C_6alcoxi, C_3-C_8cicloalquilo, C_2-C_8heterocicloalquilo, C_1-C_6hidroxialquilo y C_1-C_6haloalcoxi de R^8 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de –CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -$C(O)R^{11}$, -$OC(O)R^{11}$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(O)OR^{11}$, -$NR^9C(O)R^{11}$, -NR^9R^{10}, -$NR^{11}R^{12}$, -$N(R^9)_2$, -OR^9, -OR^{10}, -$C(O)NR^{11}R^{12}$, -$C(O)NR^{11}OH$, –$S(O)_2R^{11}$, –$S(O)R^{11}$, –$S(O)_2NR^{11}R^{12}$, -$NR^{11}S(O)_2R^{11}$, -$P(O)(OR^{11})_2$, y

-OP(O)(OR^{11})$_2$;

cada R^9 se selecciona independientemente de H, -C(O)R^8, -C(O)OR^8, -C(O)R^{10}, -C(O)OR^{10}, -S(O)$_2$$R^{10}$, -$C_1$-$C_6$ alquilo, C_1-C_6heteroalquilo y C_3-C_6cicloalquilo, o cada R^9 es independientemente un C_1-C_6alquilo que conjuntamente con N se unen para formar un C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde el anillo de C_3-C_8heterocicloalquilo contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S, y en donde los grupos C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_3-C_6cicloalquilo, o C_3-C_8heterocicloalquilo de R^9 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de –CN, R^{11}, -OR^{11}, -SR^{11}, -C(O)R^{11}, -OC(O)R^{11}, -C(O)OR^{11}, -N$R^{11}$$R^{12}$, -C(O)N$R^{11}$$R^{12}$, -C(O)N$R^{11}$OH, -S(O)$_2$$R^{11}$, -S(O)$R^{11}$, -S(O)$_2NR^{11}$$R^{12}$, -N$R^{11}$S(O)$_2$$R^{11}$, -P(O)($OR^{11}$)$_2$, y -OP(O)($OR^{11}$)$_2$;

cada R^{10} se selecciona independientemente de arilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_3-C_8heterocicloalquilo y heteroarilo, en donde los grupos arilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_3-C_8heterocicloalquilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halógeno, –R^8, -OR^8, –LR^9, -LOR^9, -N(R^9)$_2$, -NR^9C(O)R^8, -N$R^9$$CO_2$$R^8$, -$CO_2$$R^8$, -C(O)$R^8$ y -C(O)N(R^9)$_2$;

R^{11} y R^{12} se seleccionan independientemente de H, C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo, en

donde los grupos C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo de R^{11} y R^{12} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, –CN, R^8, –OR^8, -$C(O)R^8$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)OR^8$, -$N(R^9)_2$, -$NR^8C(O)R^8$, -$NR^8C(O)OR^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, C_3-C_8heterocicloalquilo, –$S(O)_2R^8$, –$S(O)_2N(R^9)_2$, -$NR^9S(O)_2R^8$, C_1-C_6haloalquilo y C_1-C_6haloalcoxi; o

R^{11} y R^{12} son cada uno independientemente C_1-C_6alquilo y tomados conjuntamente con el átomo de N al cual se unen forman un anillo de C_3-C_8heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S;

cada R^{13} se selecciona independientemente de halógeno, –CN, -LR^9, -LOR^9, -OLR^9, -LR^{10}, -LOR^{10}, -OLR^{10}, -LR^8, -LOR^8, -OLR^8, -LSR^8, -LSR^{10}, -$LC(O)R^8$, -$OLC(O)R^8$, -$LC(O)OR^8$, -$LC(O)R^{10}$, -$LOC(O)OR^8$, -$LC(O)NR^9R^{11}$, -$LC(O)NR^9R^8$, -$LN(R^9)_2$, -LNR^9R^8, -LNR^9R^{10}, -$LC(O)N(R^9)_2$, –$LS(O)_2R^8$, –$LS(O)R^8$, -$LC(O)NR^8OH$, -$LNR^9C(O)R^8$, -$LNR^9C(O)OR^8$, –$LS(O)_2N(R^9)_2$, -$OLS(O)_2N(R^9)_2$, -$LNR^9S(O)_2R^8$, -$LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, -$LP(O)(OR^8)_2$, -$LOP(O)(OR^8)_2$, -$LP(O)(OR^{10})_2$ y -$OLP(O)(OR^{10})_2$;

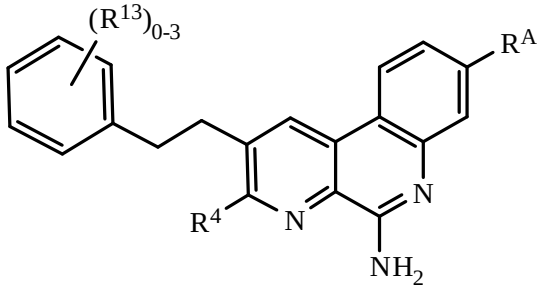
cada R^A se selecciona independientemente de –R^8, –R^7, -OR^7, -OR^8, –R^{10}, -OR^{10}, -SR^8, -NO_2, -CN, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9C(S)R^8$, -$NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9C(S)N(R^9)_2$, -$NR^9CO_2R^8$, -$NR^9NR^9C(O)R^8$, -$NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9NR^9CO_2R^8$, -$C(O)C(O)R^8$, -

$C(O)CH_2C(O)R^8$, $-CO_2R^8$, $-(CH_2)_nCO_2R^8$, $-C(O)R^8$, $-C(S)R^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(S)N(R^9)_2$, $-OC(O)N(R^9)_2$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)N(OR^8)R^8$, $-C(NOR^8)R^8$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_3R^8$, $-SO_2N(R^9)_2$, $-S(O)R^8$, $-NR^9SO_2N(R^9)_2$, $-NR^9SO_2R^8$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$, y $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$; o dos sustituyentes R^A adyacentes en el Anillo A forman un anillo de 5-6 miembros que contiene hasta dos heteroátomos como miembros de anillo;

n es, independientemente en cada ocurrencia, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; (b) un compuesto que tiene la fórmula:



en donde:

R^4 se selecciona de H, halógeno, $-C(O)OR^7$, $-C(O)R^7$, $-C(O)N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^9)_2$, $-NHN(R^9)_2$, $-SR^7$, $-(CH_2)_nOR^7$, $-(CH_2)_nR^7$, $-LR^8$, $-LR^{10}$, $-OLR^8$, $-OLR^{10}$, C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, arilo, heteroarilo, C_3-

C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde los grupos C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo de R^4 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, –CN, $-NO_2$, $-R^7$, $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-C(O)N(R^9)_2$, $–S(O)_2R^8$, $–S(O)R^8$, $–S(O)_2N(R^9)_2$, y $-NR^9S(O)_2R^8$;

cada L se selecciona independientemente de un enlace, $-(O(CH_2)_m)_t-$, C_1-C_6alquilo, C_2-C_6alquenileno y C_2-C_6alquinileno, en donde los C_1-C_6alquilo, C_2-C_6alquenileno y C_2-C_6alquinileno de L están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, $-R^8$, $-OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, y $-OP(O)(OR^{10})_2$;

R^7 se selecciona de H, C_1-C_6alquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, y C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde los grupos C_1-C_6alquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6haloalcoxi, y C_3-C_8heterocicloalquilo de R^7 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos R^{13};

cada R^8 se selecciona independientemente de H, -

$CH(R^{10})_2$, C_1-C_8alquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6haloalquilo, C_1-C_6alcoxi, C_1-C_6heteroalquilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_2-C_8heterocicloalquilo, C_1-C_6hidroxialquilo y C_1-C_6haloalcoxi, en donde los grupos C_1-C_8alquilo, C_2-C_8alqueno, C_2-C_8alquino, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, C_1-C_6alcoxi, C_3-C_8cicloalquilo, C_2-C_8heterocicloalquilo, C_1-C_6hidroxialquilo y C_1-C_6haloalcoxi de R^8 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de –CN, R^{11}, $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^9C(O)R^{11}$, $-NR^9R^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-N(R^9)_2$, $-OR^9$, $-OR^{10}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $–S(O)_2R^{11}$, $–S(O)R^{11}$, $–S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$, y $-OP(O)(OR^{11})_2$;

cada R^9 se selecciona independientemente de H, $-C(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-C_1$-C_6 alquilo, C_1-C_6heteroalquilo y C_3-C_6cicloalquilo, o cada R^9 es independientemente un C_1-C_6alquilo que conjuntamente con N se unen para formar un C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde el anillo de C_3-C_8heterocicloalquilo contienen opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S, y en donde los grupos C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_3-C_6cicloalquilo, o C_3-C_8heterocicloalquilo de R^9 están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de –CN, R^{11}, $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$,

$-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$, y $-OP(O)(OR^{11})_2$;

cada R^{10} se selecciona independientemente de arilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_3-C_8heterocicloalquilo y heteroarilo, en donde los grupos arilo, C_3-C_8cicloalquilo, C_3-C_8heterocicloalquilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halógeno, $-R^8$, $-OR^8$, $-LR^9$, $-LOR^9$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9CO_2R^8$, $-CO_2R^8$, $-C(O)R^8$ y $-C(O)N(R^9)_2$;

R^{11} y R^{12} se seleccionan independientemente de H, C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo, en donde los grupos C_1-C_6alquilo, C_1-C_6heteroalquilo, C_1-C_6haloalquilo, arilo, heteroarilo, C_3-C_8cicloalquilo, y C_3-C_8heterocicloalquilo de R^{11} y R^{12} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, $-CN$, R^8, $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-NR^8C(O)R^8$, $-NR^8C(O)OR^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, C_3-C_8heterocicloalquilo, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$, $-NR^9S(O)_2R^8$, C_1-C_6haloalquilo y C_1-C_6haloalcoxi; o

R^{11} y R^{12} son cada uno independientemente C_1-C_6alquilo y tomados conjuntamente con el átomo de N al cual se unen forman un anillo de C_3-C_8heterocicloalquilo opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S;

cada R^{13} se selecciona independientemente de halógeno, –CN, -LR^9, -LOR^9, -OLR^9, -LR^{10}, -LOR^{10}, -OLR^{10}, -LR^8, -LOR^8, -OLR^8, -LSR^8, -LSR^{10}, -$LC(O)R^8$, -$OLC(O)R^8$, -$LC(O)OR^8$, -$LC(O)R^{10}$, -$LOC(O)OR^8$, -$LC(O)NR^9R^{11}$, -$LC(O)NR^9R^8$, -$LN(R^9)_2$, -LNR^9R^8, -LNR^9R^{10}, -$LC(O)N(R^9)_2$, –$LS(O)_2R^8$, –$LS(O)R^8$, -$LC(O)NR^8OH$, -$LNR^9C(O)R^8$, -$LNR^9C(O)OR^8$, –$LS(O)_2N(R^9)_2$, -$OLS(O)_2N(R^9)_2$, -$LNR^9S(O)_2R^8$, -$LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, -$LP(O)(OR^8)_2$, -$LOP(O)(OR^8)_2$, -$LP(O)(OR^{10})_2$ y -$OLP(O)(OR^{10})_2$;

cada R^A se selecciona independientemente de –R^8, –R^7, -OR^7, -OR^8, –R^{10}, -OR^{10}, -SR^8, -NO_2, -CN, -$N(R^9)_2$, -$NR^9C(O)R^8$, -$NR^9C(S)R^8$, -$NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9C(S)N(R^9)_2$, -$NR^9CO_2R^8$, -$NR^9NR^9C(O)R^8$, -$NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, -$NR^9NR^9CO_2R^8$, -$C(O)C(O)R^8$, -$C(O)CH_2C(O)R^8$, -CO_2R^8, -$(CH_2)_nCO_2R^8$, -$C(O)R^8$, -$C(S)R^8$, -$C(O)N(R^9)_2$, -$C(S)N(R^9)_2$, -$OC(O)N(R^9)_2$, -$OC(O)R^8$, -$C(O)N(OR^8)R^8$, -$C(NOR^8)R^8$, -$S(O)_2R^8$, -$S(O)_3R^8$, -$SO_2N(R^9)_2$, -$S(O)R^8$, -$NR^9SO_2N(R^9)_2$, -$NR^9SO_2R^8$, -$P(O)(OR^8)_2$, -$OP(O)(OR^8)_2$, -$P(O)(OR^{10})_2$, -$OP(O)(OR^{10})_2$, -$N(OR^8)R^8$, -$CH=CHCO_2R^8$, -$C(=NH)$-$N(R^9)_2$, y -$(CH_2)_nNHC(O)R^8$;

n es, independientemente en cada ocurrencia, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;

cada m se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8; o

(c) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) o (b). Otros compuestos de

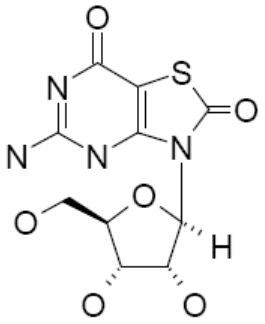
benzonaftiridinas, y métodos para producir compuestos de benzonaftiridina, se describen en WO 2009/111337. Un compuesto de benzonaftiridina, o una sal del mismo, se puede usar como está, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se puede usar un compuesto de benzonaftiridina en combinación con una emulsión de aceite en agua o una composición que contiene minerales. En una modalidad particular, se usa un compuesto de benzonaftiridina en combinación con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno-agua, tal como MF59) o una composición que contiene minerales (por ejemplo, una sal mineral tal como sal de aluminio o una sal de calcio).

- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como aquellos descritos en la referencia 94. En la referencia 94 también se describen métodos para formular, producir y examinar compuestos activos. Las tiosemicarbazonas son particularmente efectivas en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tal como TNF-α.

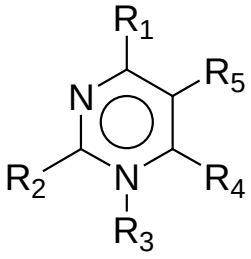
- Un compuesto de triptantrina, tal como aquellos descritos en la referencia 95. En la referencia 95 también se describen métodos para formular, producir y examinar compuestos activos. Las

tiosemicarbazonas son particularmente efectivas en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tal como TNF-α.

- Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos del mismo; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en las referencias 96 a 98; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



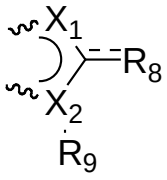
en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente H, halo, $-NR_aR_b$, -OH, C_{1-6}alcoxi, sustituido C_{1-6}alcoxi, heterociclilo, heterociclilo sustituido, C_{6-10}arilo, C_{6-10}arilo sustituido, C_{1-6}alquilo, o C_{1-6} alquilo sustituido;

R_3 está ausente, H, C_{1-6}alquilo, C_{1-6}alquilo,

sustituido C_{6-10}arilo, C_{6-10}arilo sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

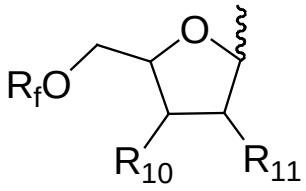
R_4 y R_5 son cada uno independientemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, -C(O)-R_d, C_{1-6}alquilo, C_{1-6}alquilo sustituido, o unidos conjuntamente para formar un anillo de 5 miembros como en R_{4-5}:



R_{4-5}

la unión que se logra en las uniones indicadas por un 〰 X_1 y X_2 son cada uno independientemente N, C, O, o S; R_8 es H, halo, -OH, C_{1-6} alquilo, C_{2-6}alquenilo, C_{2-6}alquinilo, -OH, -NR_aR_b, -$(CH_2)_n$-O-R_c, -O-(C_{1-6} alquilo), -$S(O)_pR_e$, o -C(O)-R_d;

R_9 es H, C_{1-6}alquilo, C_{1-6}alquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a}, en donde R_{9a} es:



R_{9a}

la unión que se logra en la unión indicada por un 〰 R_{10} y R_{11} son cada uno independientemente H, halo, C_{1-6}alcoxi, C_{1-6}alcoxi sustituido, -NR_aR_b, o -OH;

cada R_a y R_b es independientemente H, C_{1-6}alquilo,

C_{1-6}alquilo sustituido, -C(O)R_d, C_{6-10}arilo;

cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, C_{1-6}alquilo, o C_{1-6}alquilo sustituido;

cada R_d es independientemente H, halo, C_{1-6}alquilo, sustituido C_{1-6}alquilo, C_{1-6}alcoxi, C_{1-6}alcoxi sustituido, -NH_2, -NH(C_{1-6}alquilo), -NH(C_{1-6}alquilo sustituido), -N(C_{1-6}alquil)$_2$, -N(C_{1-6}alquilo sustituido)$_2$, C_{6-10}arilo, o heterociclilo;

cada R_e es independientemente H, C_{1-6}alquilo, C_{1-6}alquilo sustituido, C_{6-10} arilo, C_{6-10} arilo sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, C_{1-6}alquilo, C_{1-6}alquilo sustituido, -C(O)R_d, fosfato, difosfato, o trifosfato;

cada n es independientemente 0, 1, 2, o 3;

cada p es independientemente 0, 1, o 2; o

(g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (99).

Compuestos descritos en la referencia 100, que incluyen: compuestos de Acilpiperazina, compuestos de Indoldiona, compuestos de Tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de Benzociclodiona, compuestos de Aminoazavinilo, compuestos de Aminobencimidazol-quinolinona (ABIQ) (101, 102), compuestos de Hidraftalamida, compuestos de

Benzofenona, compuestos de Isoxazol, compuestos de Esterol, compuestos de Quinazilinona, compuestos de Pirrol (103), compuestos de Antraquinona, compuestos de Quinoxalina, compuestos de Triazina, compuestos de Pirazalopirimidina, y compuestos de Benzazol (104).

- Compuestos descritos en la referencia 105.

- Derivado de fosfato de aminoalquil-glucosaminida tal como RC-529 (106, 107).

- Un fosfaceno, tal como poli[di (carboxilatofenoxi)fosfaceno] (“PCPP”) como se describe, por ejemplo, en la referencia 108 y 109.

- innumopotenciadores de molécula pequeña (SMIP, por sus siglas en inglés) tal como:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina

1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina

2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol

Acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo

4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

1-[4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-

c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol

N4,N4-dibenzil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina.

Los agentes inductores de citocinas para uso en la presente invención pueden ser moduladores y/o agonistas de los Receptores Tipo Toll (TLR). Por ejemplo, pueden ser agonistas de uno o más de las proteínas humanas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, y/o TLR9. Los agentes preferidos son agonistas de TLR4 (por ejemplo, lípido natural modificado como se deriva de lipopolisacáridos enterobacterianos, compuestos de fosfolípido, tal como el dímero de fosfolípido sintético, E6020), TLR7 (por ejemplo, benzonaftiridinas, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos de CpG). Estos agentes son útiles para activar rutas inmunitarias innatas.

El agente inductor de citocina se puede adicionar a la composición en varias etapas durante su producción. Por ejemplo, puede estar dentro de una composición de antígeno, y esta mezcla entonces se puede adicionar a una emulsión de aceite en agua. Como una alternativa, puede estar dentro de una emulsión de aceite en agua, caso en el cual el agente ya sea se puede adicionar a los componentes de la emulsión antes del emulsionamiento, o se puede adicionar a la emulsión

después del emulsionamiento. De manera similar, el agente se puede coacervar dentro de las gotas de emulsión. La ubicación y distribución del agente inductor de citocinas dentro de la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, por ejemplo, el agente puede estar localizado en la fase acuosa, en la fase de aceite y/o en la entrecara de aceite-agua.

El agente inductor de citocinas se puede conjugar a un agente separado, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). En la referencia 110 se proporciona una revisión general de las técnicas de conjugación para moléculas pequeñas. Como una alternativa, los adyuvantes se pueden asociar de forma no covalente con agentes adicionales, tal como por medio de interacciones hidrófobas o iónicas.

Los agentes inductores de citocinas, preferidos son: (a) compuestos de benzonaftridina, (b) oligonucleótidos inmunoestimuladores y (c) 3dMPL.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tal como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble hebra o de hebra individual (excepto para ARN). Las referencias 111, 112, y 113 describen posibles sustituciones análogas, por ejemplo, reemplazo de guanosina con 2’-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se analiza adicionalmente en las referencias 114 a 119.

Una secuencia de CpG se puede dirigir a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT (120). La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una inmuno-respuesta Th1, tal como un CpG-A ODN (oligodesoxinucleótido), o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como un CpG-B ODN. Los CpG-A y CpG-B ODN se analizan en las referencias 121-123. De manera preferente, el CPG es un CpG-A ODN. De manera preferente, el oligonucleótido de CpG se construye de modo que extremo 5’ es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, se pueden unir dos secuencias de oligonucleótido de CpG en sus extremos 3’ para formar “inmunómeros”. Ver, por ejemplo, referencias 120 y 124-126. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como PROMUNE^{MR} (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como una alternativa, o adicionalmente, al usar secuencias de CpG, se pueden usar secuencias de TpG (127). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados.

El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido consecutivo de timidina (por ejemplo, TTTT, como se describe en la referencia 127), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% timidina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etcétera). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citocina consecutivo (por

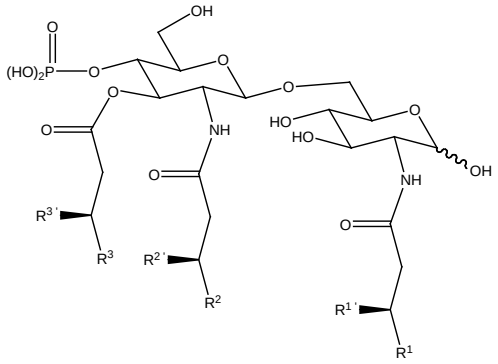
ejemplo, CCCC, como se describe en la referencia 127), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de citocina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etcétera). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán típicamente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

3dMPL (también conocido como monofosforil-lípido A des-O-acilado o 3-O-desacil-4’-monofosforil-lípido A) es un adyuvante en el cual se ha des-acilado la posición 3 de la glucosamina terminal reductora en el monofosforil-lípido A. Se ha preparado 3dMPL de un mutante heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a base. Activa células de linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF-α y GM-CSF (ver también referencia 128). La preparación de 3dMPL se describió originalmente en la referencia 129.

3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, variando su acilación (por ejemplo, que tiene 3, 4, 5 o 6 cadenas de acilo, que pueden ser de longitudes diferentes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocidos como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-

acilados en sus carbonos de la posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2’), y también hay O-acilación en la posición 3’. El grupo unido al carbono 2 tiene la fórmula –NH-CO-CH_2-CR^1R^1. El grupo unido al carbono 2’ tiene la fórmula –NH-CO-CH_2-CR^2R^2. El grupo unido al carbono 3’ tiene la fórmula –O-CO-CH_2-CR^3R^3. Una estructura representativa es:



Los grupos R^1, R^2 y R^3 son cada uno independientemente -$(CH2)_n$-CH_3. El valor de n está de manera preferente entre 8 y 16, de manera más preferente entre 9 y 12, y de manera más preferente es 10.

Los grupos $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ pueden ser cada uno independientemente: (a)-H, (b)-OH, o (c)-O-CO-R^4, donde R^4 es ya sea -H o - $(CH_2)_m$-CH_3, en donde el valor de m está de de manera preferente entre 8 y 16, y es de manera más preferente 10, 12 o 14. En la posición 2, *m* es preferentemente 14. En la posición 2’, *m* es de manera preferente 10. En la posición 3’, *m* es preferente 12. Los grupos $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ de esta manera son de manera preferente grupos –O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ son –H entonces el 3dMPL tiene solo 3 cadenas de acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2′ y 3′). Cuando solo dos de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ son –H entonces el 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Cuando solo uno de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ es -H entonces el 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Cuando ninguno de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ es -H entonces el 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante 3dMPL usado de acuerdo a la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas de acilo, pero se prefiere incluir 3dMPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla, y en particular para asegurarse que la forma de cadena de hexaacilo constituya hasta 10% en peso del 3dMPL total, por ejemplo, >20%, >30%, >40%, >50% o más. 3dMPL con 6 cadenas de acilo se ha encontrado que es la forma más activa de adyuvante.

De esta manera, la forma más preferida de 3dMPL para inclusión en las composiciones de la invención tiene la fórmula (IV), mostrada más adelante.

Donde se usa 3dMPL en la forma de una mezcla entonces las referencias a cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a la especie de 3dMPL combinada en la mezcla.

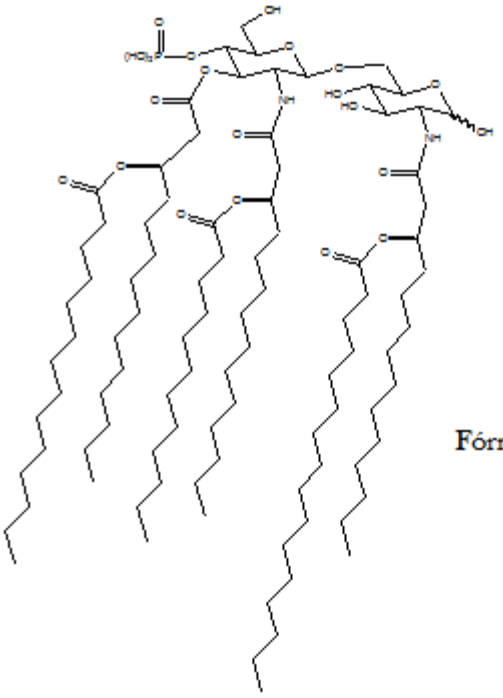
En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo con un diámetro de <150nm o >500

nm. Cualquiera o ambos de estos se pueden usar con la invención, y se pueden seleccionar las mejores partículas por ensayo de rutina. Se prefieren partículas más pequeñas (por ejemplo, suficientemente pequeñas para dar una suspensión acuosa clara de 3dMPL) para el uso de acuerdo a la invención debido a su actividad superior (130). Las partículas preferidas tienen un diámetro medio menor de 220 nm, de manera más preferente menor de 200 nm o menos de 150nm o menos de 120 nm, y pueden tener un diámetro medio menor de 100 nm. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor de 50 nm. Estas partículas son suficientemente pequeñas para ser adecuadas para la filtración por filtro. El diámetro de partículas se puede valorar por técnica de rutina de dispersión de luz dinámica, que revela un diámetro medio de partícula. Donde se dice que una partícula tiene un diámetro de *x* nm, en general habrá una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos 50% en número (por ejemplo, >60%, >70%, >80%, >90%, o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo *x*+25%.

Se puede usar de manera ventajosa 3dMPL en combinación con una emulsión de aceite en agua. Sustancialmente todo 3dMPL puede estar localizado en la

fase acuosa de la emulsión.

El 3dMPL se puede usar en sí mismo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se conoce usar 3dMPL en combinación con la saponina QS21 (131) (que incluye en una emulsión de aceite en agua (132)), con un oligonucleótido inmunoestimulador, tanto con QS21 como con un oligonucleótido inmunoestimulador, con fosfato de aluminio (133), con hidróxido de aluminio (134), o con tanto fosfato de aluminio como con hidróxido de aluminio.



Fórmula (IV)

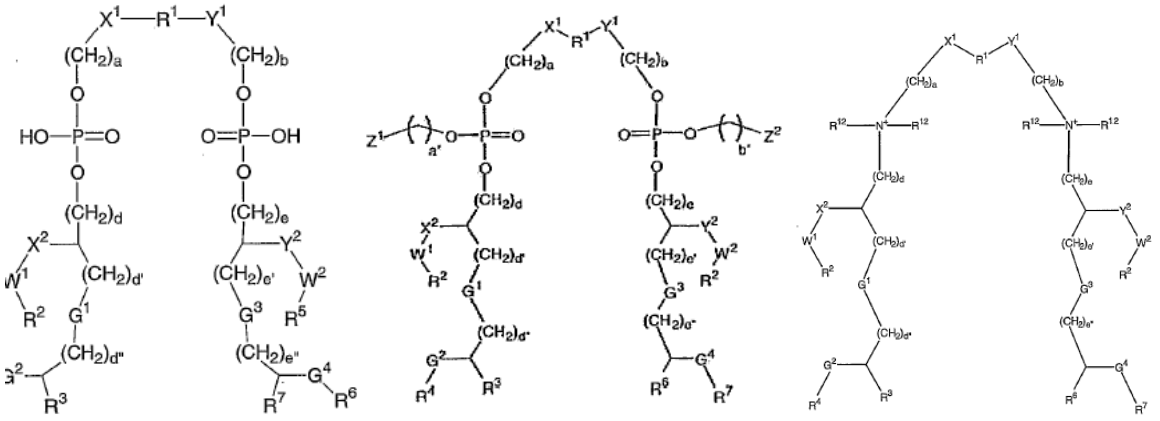
Adyuvantes grasos

Los adyuvantes grasos que se pueden usar con

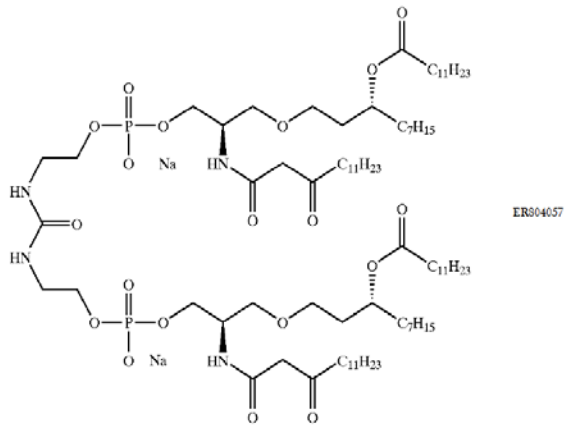
la invención incluyen las emulsiones de aceite en agua descritas anteriormente, y también incluyen, por ejemplo:

- Un compuesto de fosfolípido de la fórmula I, II o III, o una sal del mismo:

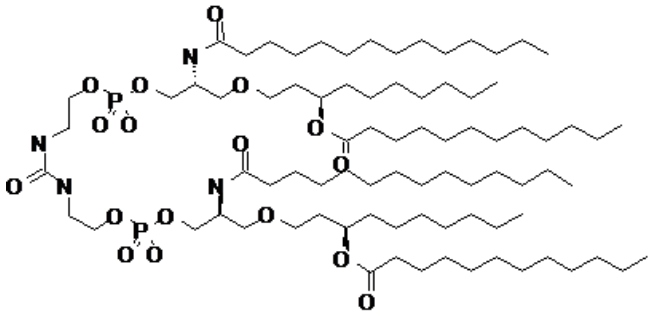
I II III



como se define en la referencia 135, tal como ‘ER 803058’, ‘ER 803732’, ‘ER 804053’, ‘ER 804058’, ‘ER 804059’, ‘ER 804442’, ‘ER 804680’, ‘ER 804764’, ‘ER 803022’ o ‘ER 804057’, por ejemplo:



ER804057



ER-803022.

ER804057 también se llama E6020. Un compuesto de

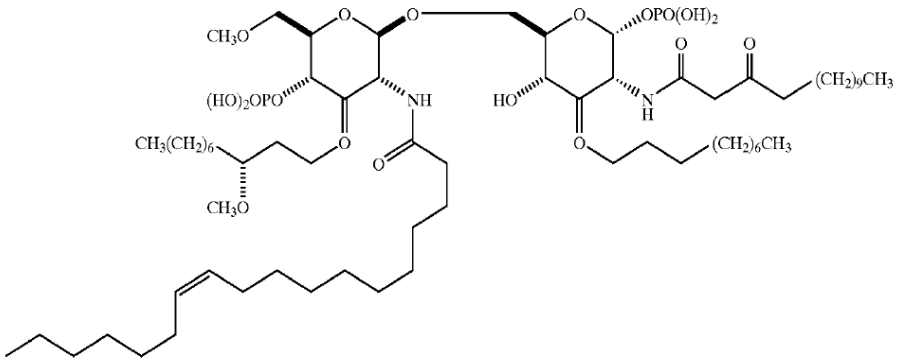
fosfolípido de la fórmula I, II o III, o una sal del mismo, se puede usar en sí mismo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se puede usar compuesto de fórmula I, II o III, en combinación con una emulsión de aceite en agua o una composición que contiene minerales. En una modalidad particular, se usa E6020 en combinación con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una emulsión de escualeno-agua, tal como MF59) o una composición que contiene minerales (por ejemplo, una sal mineral tal como una sal de aluminio o una sal de calcio).

- Derivados de lípido A de *Escherichia coli* tal como OM-174 (descrito en las referencias 136 y 137).

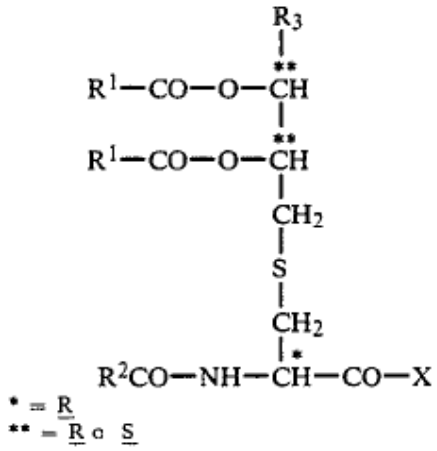
- Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (usualmente neutral), tal como bromuro de aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio-difitanoil-fosfatidil-etanolamina (“VAXFECTIN (MR)”) o bromuro de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio-dioleoil-fosfatidil-etanolamina (“GAP-DLRIE:DOPE”). Se prefieren (138) formulaciones que contienen sales de (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeceneiloxi)-1-propanaminio.

- Monofosforil-lípido A 3-O-desacilado. (ver anteriormente)

- Compuestos que contienen lípidos enlazados a una estructura cíclica que contiene fosfato, tal como el antagonista de TLR4 E5564 (139, 140):



- Lipopéptidos (es decir, compuestos que comprenden uno o más residuos de ácido graso y dos o más residuos de aminoácido), tal como lipopéptidos basados en glicerilcisteína. Los ejemplos específicos de estos péptidos incluyen compuestos de la siguiente fórmula

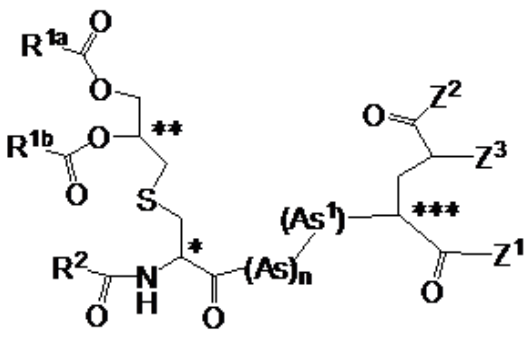


en la cual cada uno de R^1 y R^2 representa un radical de hidrocarburo alifático-cicloalifático, saturado o insaturado, alifático o mezclado que tiene de 8 a 30, de manera preferente de 11 a 21 átomos de carbono que también está opcionalmente sustituido por funciones de oxígeno, R^3 representa hidrógeno o el radical R_1-CO-O-CH_2- en el cual R^1

tiene el mismo significado como antes, y X representa un aminoácido unido por un enlace peptídico y que tiene un grupo carboxi libre, esterificado o amidado, o una secuencia de aminoácidos de 2 a 10 aminoácidos de la cual el grupo carboxi terminal está en una forma libre, esterificada o amidada. En ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos comprende un D-aminoácido, por ejemplo, ácido D-glutámico (D-Glu) o ácido D-gamma-carboxi-glutámico (D-Gla).

Los lipopéptidos bacterianos reconocen en general TLR2, sin que se requiera y que participe TLR6. (TLR opera cooperativamente para proporcionar reconocimiento específico de varios activadores, y TLR2 y TLR6 reconocen juntamente peptidoglicanos, en tanto que TLR2 reconoce lipopéptidos sin TLR6). Estos algunas veces se clasifican como lipopéptidos naturales y lipopéptidos sintéticos. Los lipopéptidos sintéticos tienden a comportarse de forma similar, y se reconocen principalmente por TLR2.

Los lipopéptidos adecuados para el uso como adyuvantes incluyen compuestos que tienen la fórmula



en donde el centro quiral marcado * y el marcado *** están ambos en la configuración R;

el centro quiral marcado ** está ya sea en la configuración R o S;

cada uno R^{1a} y R^{1b} es independientemente un grupo de hidrocarburo alifático o cicloalifático-alifático que tiene 7-21 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por funciones de oxígeno, o uno de R^{1a} y R^{1b}, pero no ambos, es H;

R^2 es un grupo de hidrocarburo alifático o cicloalifático que tiene 1-21 átomos de carbono y opcionalmente está sustituido por funciones de oxígeno;

n es 0 o 1;

As representa ya sea -O-Kw-CO- o -NH-Kw-CO-, donde Kw es un grupo de hidrocarburo alifático que tiene 1-12 átomos de carbono;

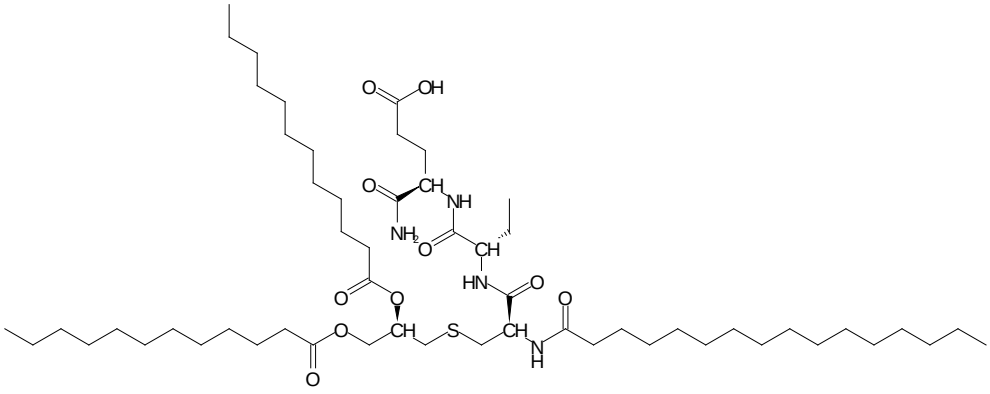
As^1 es un D- o L-alfa-aminoácido;

Z^1 y Z^2 representan cada uno independientemente –OH o el radical N-terminal de un ácido D- o L-alfa aminoácido de un ácido amino (alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionado de los ácidos D- y L-alfa aminocarboxílicos y ácidos amino-alquilo inferior-sulfónicos, y

Z^3 es H o -CO-Z^4, cuando Z^4 es -OH o el radical N-terminal de un D- o L-alfa aminoácido de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6

aminoácidos seleccionado de los ácidos D- y L-alfa aminocarboxílicos, y ácidos amino-alquilo inferior-sulfónicos, o un éster o amida formada del ácido carboxílico de estos compuestos. Las amidas adecuadas incluyen -NH_2 y NH(alquilo inferior), y los ésteres adecuados incluyen ésteres de C_1-C_4alquilo. (Alquilo inferior o alcano inferior, como se usa en la presente, se refiere a alquilos de cadena recta o ramificada de C_1-C_6).

Estos compuestos se describen en más detalle en U.S 4,666,886. En una modalidad particular, el lipopéptido tiene la fórmula:



Otro ejemplo de una especie de lipopéptido se llama LP40, y es un agonista de TLR2. Akdis, et al., *Eur. J. Immunology*, 33: 2717-26 (2003).

Estos están relacionadas a una clase conocida de lipopéptidos de *E. coli*, referidos como lipoproteínas de mureína. Ciertos productos de degradación parcial de estas proteínas llamados lipopéptidos de mureína se describen en

Hantke, et al. *Eur. J. Biochem,* 34:284-296 (1973). Estos comprenden un péptido enlazado a ácido N-acetil-murámico y de esta manera se relacionan a péptidos de muramilo, que se describen en Baschang, et al, *Tetrahedron*, 45(20):6331-6360 (1989).

Adyuvantes de sales de aluminio

Se usar los adyuvantes conocidos como “hidróxido de aluminio” y “fosfato de aluminio”. Estos nombres son convencionales, pero se usan por conveniencia únicamente, puesto que no es una descripción precisa del compuesto químico real que se presenta (por ejemplo, ver capítulo 9 de la referencia 74). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de “hidróxido” o de “fosfato” que son de uso general como coadyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como “hidróxido de aluminio” son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que usualmente son al menos parcialmente cristalinos. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar por la fórmula AlO (OH), se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tal como hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, por espectroscopia infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de absorción con $1070cm^{-1}$ y un resalto fuerte en $3090\text{-}3100cm^{-1}$ (capítulo 9 de referencia 74). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de la banda de difracción a

media altura (WHH), con partículas pobremente cristalinas que muestran mayor ensanchamiento de línea debido a menores tamaños de cristalitos. El área superficial se incrementa con el incremento de WHH, y se ha visto que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad para adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se ve en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica para adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pI de los adyuvantes de hidróxido de aluminio típicamente cerca de 11, es decir, el adyuvante mismo tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Las capacidades adsorbentes de entre 1.8-2.6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7.4 se han reportado para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como “fosfato de aluminio” son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que también contienen frecuentemente una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación tienen influencia en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen en general una relación molar de PO_4/Al entre 0.3 y 1.2. Se pueden distinguir hidroxifosfatos de $AlPO_4$ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro de IR en $3164cm^{-1}$ (por ejemplo, cuando se calienta a 200ºC) indica

la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de referencia 74).

La relación molar PO_4/Al^{3+} de un adyuvante de fosfato de aluminio estará en general entre 0.3 y 1.2, de manera preferente entre 0.8 y 1.2, y manera más preferente 0.95+0.1. El fosfato de aluminio en general, será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar de PO_4/Al entre 0.84 y 0.92, incluida a 0.6 mg de Al^{3+}/ml. El fosfato de aluminio en general estará en partículas (por ejemplo, morfología tipo placa como se ve en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0.5-20µm (por ejemplo, aproximadamente 5-10µm) después de cualquier adsorción de antígeno. Las capacidades adsorbentes de entre 0.7-1.5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7.4 se han reportado para adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC, por sus siglas en inglés) de fosfato de aluminio se relaciona inversamente al grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y éste grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. También se altera el PZC al cambiar la concentración de iones fosfatos libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o al adicionar un

amortiguador tal como un amortiguador de histidina (más PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo a la invención tendrán en general un PZC de entre 4.0 y 7.0, más de manera más preferente entre 5.0 y 6.5, por ejemplo, aproximadamente 5.7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención puede contener una amortiguador (por ejemplo, un fosfato o una histidina o un amortiguador Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y están libres de pirógenos. Una suspensión puede incluir grupos fosfato, acuosos, libres, por ejemplo, presentes a una concentración de entre 1.0 y 20 mm, de manera preferente entre 5 y 15 mM, y de manera más preferente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

La invención puede usar una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como de un fosfato de aluminio. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo, >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etcétera.

La concentración de Al^{+++} en una composición para la administración a un paciente es de manera preferente menos de 10 mg/ml por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/m, etcétera. Un intervalo preferido está entre 0.3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de 0.85 mg/dosis.

Así como incluir uno o más adyuvantes de sal de aluminio, el componente de adyuvante puede incluir uno o más agentes adyuvantes o inmunoestimuladores adicionales. Estos componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a: un compuesto de benzonaftiridina, un adyuvante de monofosforil-lípido a 3-O-desacetilado (“3d-MPL”), y/o una emulsión de aceite en agua. También se ha referido 3d-MPL como monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado o como un 3-O-desacil-4’-monofosforil lípido A. El nombre indica que la posición 3 de glucosamina terminal reductora en el monofosforil-lípido A está des-acilada. Se ha preparado de un mutante sin heptosa de *S.minnesota*, y es químicamente similar a lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a base. Activa células de linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF-α y GM-CSF. La preparación de 3d-MPL se describió originalmente en la referencia 129, y el producto se ha producido y vendido por Corixa Corporation bajo el nombre MPL (MR). Se pueden encontrar detalles adicionales en las referencias 82 a 85.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio es útil, en particular en niños, y los antígenos se adsorben en general a estas sales. También se prefieren emulsiones de escualeno en agua particularmente en las personas de edad avanzada. Las combinaciones útiles de

adyuvante incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2, tal como CpG y alumbre, o resiquimod y alumbre. Se puede usar una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL. Otras combinaciones que se pueden usar incluyen: alumbre y un compuesto de benzonaftridina o un SMIP, una emulsión de escualeno en agua (tal como MF59) y un compuesto de benzonaftridina o un SMIP y E6020 y una emulsión de escualeno en agua, tal como MF59) o alumbre.

Las composiciones de la invención pueden producir tanto una respuesta inmunitaria mediada por células, así como una respuesta inmunitaria humoral.

En general se piensa que son necesarios dos tipos de células T, células CD4 y CD8, para iniciar y/o mejorar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. Las células T CD8 puede expresar un co-receptor de CD8 y se refieren comúnmente como linfocitos T citotóxicos (CTL). Las células T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en moléculas de MHC Clase I.

Las células T CD4 pueden expresar un co-receptor de CD4 y se refieren comúnmente como células auxiliares T. Las células T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas de MHC clase II. En la interacción con una molécula de MHC clase II, células CD4 pueden segregar factores tal como citocina. Estas citocinas segregada pueden activar células B, células T citotóxicas, macrófagos y otras

células que participan en una respuesta inmunitaria. Las células T auxiliares o células CD4+ se pueden dividir adicionalmente en dos subconjuntos funcionalmente distintos: fenotipo TH1 y fenotipo TH2 que difieren en su función efectora y citocinas.

Las células TH1 activadas mejoran la inmunidad celular (incluyendo un incremento en la producción de CTL específica de antígeno) y por lo tanto son de valor particular al responder a infecciones intracelulares. Las células TH1 activadas pueden segregar uno o más de IL-2, IFN-γ y TNF-β. Una respuesta inmunitaria de TH1 puede dar por resultado reacciones inflamatorias locales al activar macrófagos, células NK (aniquiladoras naturales) y células T citotóxicas CD8 (CTL). Una respuesta inmunitaria de TH1 también puede actuar para expandir la respuesta inmunitaria al estimular el crecimiento de células B y T con IL-12. Las células B estimuladas con TH1 pueden segregar IgG2a.

Las células TH2 activadas mejoran la producción de anticuerpos y por lo tanto son valor en la respuesta a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas pueden segregar uno o más de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Una respuesta inmunitaria de TH2 puede dar por resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria para protección futura.

Una respuesta inmunitaria mejorada puede incluir una o más de una respuesta inmunitaria de TH1 mejorada y una

respuesta inmunitaria de TH2.

Una respuesta inmunitaria de TH1 puede incluir uno o más de un incremento en CTL, un incremento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de TH1 (tal como IL-2, IFN-γ y TNF-β), un incremento en macrófagos activados, un incremento en la actividad de NK, o un incremento en la producción de IgG2a. De manera preferente, la respuesta inmunitaria mejorada de TH1 incluirá un incremento en la producción de IgG2a.

Una respuesta inmunitaria de TH1 se puede producir usando adyuvante TH1. Un adyuvante TH1 producirá en general niveles incrementados de producción de IgG2a con relación a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes TH1 adecuados para el uso en la invención pueden incluir, por ejemplo formulaciones de saponina, virosomas y partículas tipo virus, derivados no tóxicos de lipopoli-sacárido enterobacteriano (LPS), oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los oligonucleótidos inmunoestimula-dores, tal como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG, son adyuvantes TH1 preferidos para el uso en la invención.

Una respuesta inmunitaria de TH2 puede incluir uno o más de un incremento en una o más de las citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de TH2 (tal como, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un incremento en la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria. De manera preferente,

la respuesta inmunitaria mejorada de TH2 incluirá un incremento en la producción de IgG1.

Una respuesta inmunitaria de TH2 se puede producir usando un adyuvante de TH2. Un adyuvante de TH2 producirá en general niveles incrementados de producción de IgG1 con relación a inmunización del antígeno sin adyuvante. Los adyuvantes de TH2 adecuados para el uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones de aceite y toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de los mismos. Las composiciones que contienen minerales, tal como sales de aluminio son adyuvantes TH2 preferidos para el uso en la invención.

Una composición puede incluir una combinación de un adyuvante TH1 y un adyuvante TH2. De manera preferente, esta composición produce una respuesta mejorada de TH1 y una respuesta mejorada de TH2, es decir, un incremento en la producción de IgG1 e IgG2a con relación a la inmunización sin un adyuvante. De manera aun más preferente, la composición que comprende una combinación de adyuvante TH1 y TH2 produce una respuesta inmunitaria incrementada de TH1 y/o incrementada de TH2 con relación a la inmunización con un adyuvante individual (es decir, con relación a la inmunización con un adyuvante TH1 solo o inmunización con un adyuvante TH2 solo).

La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de

una respuesta inmunitaria de TH1 y una respuesta de TH2. De manera preferente, la respuesta inmunitaria proporciona una o ambas de una respuesta mejorada de TH1 y una respuesta mejorada de TH2.

La respuesta inmunitaria mejorada por una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica o mucosa. De manera preferente, la respuesta inmunitaria proporciona una o ambas de respuesta inmunitaria sistémica mejorada y mucosa mejorada. De manera preferente, la respuesta inmunitaria mucosa es una respuesta inmunitaria de TH2. De manera preferente, la respuesta inmunitaria mucosa incluye un incremento en la producción de IgA.

Métodos de tratamiento y administración

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a mamíferos, y la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, que comprende el paso de administración una composición (por ejemplo, una composición inmunogénica) de la invención al mamífero. Las composiciones (por ejemplo, una composición inmunogénica) se pueden usar para producir una formulación de vacuna para inmunizar un mamífero. Los mamíferos son típicamente un humano, y el ecto-dominio de proteína F de RSV es típicamente un ecto-dominio de proteína F de VRS de humano. Sin embargo, el mamífero puede ser cualquier otro mamífero que sea susceptible a infección con

RSV, tal como una vaca que se puede infectar con RSV bovino. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria se puede formular después de la administración de una proteína F de RSV, purificada, una partícula alfavirus o ARN auto-replicante.

La invención también proporciona una composición de la invención para el uso como un medicamento, por ejemplo, para el uso al inmunizar un paciente contra infección de RSV.

La invención también proporciona el uso de un polipéptido como se describe anteriormente en la elaboración de un medicamento para formular una respuesta inmunitaria en un paciente.

La respuesta inmunitaria formulada por estos métodos y usos incluirá en general una respuesta de anticuerpo, de manera preferente una respuesta de anticuerpo protectora. Los métodos para valorar la respuesta de anticuerpo después de la vacunación de RSV son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones de la invención se pueden administrar de varias maneras adecuadas, tal como inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o pierna), inyección subcutánea, administración intranasal, administración oral, administración intradérmica, administración transcutánea, administración transdérmica, y similares. La ruta apropiada de administración dependerá de la edad, salud y otras características del mamífero. Un facultativo será capaz de

determinar una ruta apropiada de administración en base a estos y otros factores.

Las composiciones inmunogénicas, y formulaciones de vacuna, se pueden usar para tratar tanto niños como adultos, incluyendo mujeres embarazadas. De esta manera, un sujeto puede ser de menos de un 1 año, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los sujetos preferidos para recibir las vacunas son los de edad avanzada (por ejemplo, >50 años de edad, >60 años de edad y de manera preferente >65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, <6 años de edad, tal como 4 a 6 años de edad, <5 años de edad) y mujeres embarazadas. Las vacunas no son adecuadas solo para estos grupos, sin embargo, y se pueden usar más generalmente en una población.

El tratamiento puede ser por un programa de dosis individual o un programa de múltiples dosis. Se pueden usar múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las varias dosis se pueden dar por la misma o diferente ruta, por ejemplo, una cebadura parenteral y refuerzo mucoso, una cebadura mucosa y refuerzo parenteral, etcétera. La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente sin tratamiento previo. Las múltiples dosis se administrarán típicamente con al menos 1 semana de

separación (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, y similares).

Las formulaciones de vacuna producidas usando una composición de la invención se pueden administrar a pacientes sustancialmente al mismo tiempo, como (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita médica a un profesional de cuidado de la salud o centro de vacunación) otras vacunas.

Aspectos adicionales de la invención

La invención también proporciona un polipéptido (por ejemplo, polipéptido recombinante) que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde (i) el primer dominio comprende un ectodominio de glicoproteína F de RSV, en totalidad o en parte, y (ii) el segundo dominio comprende un dominio heterólogo de oligomerización. Los detalles adicionales se proporcionan anteriormente. Si el dominio de oligomerización comprende una secuencia heptad (por ejemplo, la secuencia de GCN descrita anteriormente), entonces es preferentemente una fase de repetición heptad con la secuencia de HR2 (si está presente) del ectodominio.

La invención también proporciona ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica para este polipéptido. También proporciona vectores que incluyan estos ácidos

nucleicos, y células hospedadoras que incluyen estos vectores. Los vectores se pueden usar para, por ejemplo, propósitos de expresión recombinante, inmunización con ácidos nucleicos, etcétera.

La invención también proporciona una composición que comprende moléculas que comprenden ectodominios de glicoproteína F de RSV, en donde los ectodominios de al 50% (por ejemplo, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%) de las moléculas están presentes en una conformación de pre-fusión.

Otros virus

Así como se usan con RSV de humano, la invención se puede usar con otros miembros de *Pneumoviridae* y *Paramyxoviridae*, incluyendo, pero no limitado a, virus sincitial respiratorio bovino, virus 1 de parainfluenza, virus 2 de parainfluenza, virus 3 de parainfluenza y virus 5 de parainfluenza.

De esta manera, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una glicoproteína F de un *Pneumoviridae* o *Paramyxoviridae*, en donde la glicoproteína F está en la conformación de pre-fusión.

La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que presenta un epítopo presente en una conformación de pre-fusión de la glicoproteína F de un *Pneumoviridae* o *Paramyxoviridae*, pero

está ausente la conformación de post-fusión de la glicoproteína.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde (i) el primer dominio comprende un ectodominio de la glicoproteína F de un *Pneumoviridae* o *Paramyxoviridae*, en totalidad o en parte, y (ii) el segundo dominio comprende un dominio heterólogo de oligomerización.

La invención también proporciona estos polipéptidos y composiciones para el uso en la inmunización, etcétera.

La invención también proporciona una composición que comprende moléculas que comprenden ectodominios de glicoproteína F de RSV, en donde los ectodominios de al menos 50% (por ejemplo, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%) de las moléculas están presentes en una conformación de pre-fusión o una conformación intermedia.

Polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV

Los polipéptidos particulares de ecto-dominio de proteína F de RSV se usan o incluyen en algunas modalidades de la invención. Algunos de los polipéptidos particulares de ecto-dominio de proteína F de RSV contienen secuencias alteradas de aminoácidos de aproximadamente la posición 100 a aproximadamente la posición 161. Las secuencias de aminoácidos de la posición 100 a la posición 150 para varios polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV

particulares se muestra en la Figura 1C. Las secuencias de aminoácidos de varios polipéptidos particulares de ecto-dominio de proteína F de RSV se presentan en la presente, por ejemplo, en el ejemplo 1.

Aspectos generales

El término “que comprende” abarca “que incluye” así como “que consistente” y “que consiste esencialmente de”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ejemplo, X+Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Donde es necesario, se puede omitir la palabra “sustancialmente” de la definición de la invención.

El término “aproximadamente” con relación a un valor x numérico significa, por ejemplo, x±l0%.

A menos que se señale específicamente, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. De esta manera, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Donde haya tres componentes entonces se pueden combinar dos componentes entre sí, y luego la combinación se puede combinar con el tercer componente, etcétera.

Donde se usen materiales de animales (y en

particular de bovino), en el cultivo de células, se deben obtener de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSR), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). En general, se prefiere cultivar células en la ausencia total de materiales derivados de animales.

Donde ser administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición entonces ese compuesto se puede reemplazar de manera alternativa por un profármaco adecuado.

Donde se usa un sustrato celular para reclasificación o procedimientos de genética invertida, se prefiere que sea uno que sea aprobado para el uso en producción de vacunas humanas, por ejemplo en el capítulo 5.2.3., general de Ph Eur.

La identidad entre secuencias de polipéptidos se determina de preferentemente por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de separación afín con parámetros, penalidad de abertura de separación = 12 y penalidad de extensión de separación = 1.

Tabla 1. Fosfolípidos

DDPC	1,2-Didecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPA	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfato
DEPC	1,2-Erucoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DEPE	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

DEPG	1,2-Dierucoil-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DLOPC	1,2-Linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPA	1,2-dilauroilo-sn-glicero-3-fosfato
DLPC	1,2-dilauroilo-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilauroilo-sn-glicero-3-fosfatidiletanol-amina
DLPG	1,2-dilauroilo-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DLPS	1,2-dilauroilo-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DMG	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DMPA	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPE	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanol-amina
DMPG	1,2-miristoil-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DMPS	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DOPA	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)
DOPS	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina
DPPA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato

DPPC 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

DPPE 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanol-amina

DPPG 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)

DPPS 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina

DPyPE 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DSPA 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfato

DSPC 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

DSPE 1,2-Diostearpil-sn-glicero-3-fosfatidiletanol-amina

DSPG 1,2-distearoil-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol...)

DSPS 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilserina

EPC PC de huevo

HEPC PC de huevo hidrogenado

HSPC PC de soya hidrogenado de alta pureza

HSPC PC soya hidrogenada

LYSOPC MYRISTIC 1-Miristoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

LYSOPC PALMITIC 1-Palmitoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

LYSOPC ESTEARIC 1-Estearoil-sn-Glicero-3-fosfatidilcolina

Milk Sphingomyelin MPPC 1-miristoil,2-palmitoil-sn-glicero 3-fosfatidilcolina

MSPC 1-miristoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

PMPC 1-palmitoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

POPC 1-palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

POPE 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-etanolamina

POPG 1,2-dioleoil-sn-glicero-3[Fosfatidil-rac-(1-glicerol)...]

PSPC 1-palmitoil,2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

SMPC 1-estearoil,2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

SOPC 1-estearoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

SPPC 1-estearoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina

Ejemplificación

Ejemplo 1-polipéptidos F de RSV

Este ejemplo proporciona secuencias de varios ejemplos de polipéptidos (por ejemplo, que contienen secuencias de señal) y secuencias de ácido nucleico que se pueden usar para expresar polipéptidos F de RSV de la presente invención. Las secuencias de aminoácidos presentadas

incluyen el péptido de señal y contienen un ligador C-terminal opcional y marca His (GGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO: 90)). Cuando estos polipéptidos se producen en células hospedadoras, el polipéptido usualmente se procesará por la célula para remover el péptido de señal y, como se describe en la presente, se escindirán algunos de los polipéptidos, por ejemplo, en sitios no modificados de escisión con furina. La invención incluye composiciones que contienen, todas las formas de los polipéptidos particulares de ecto-dominio de proteína F de RSV descritos en la presente, incluyendo formas maduras, que carecen del péptido de señal, formas que se pueden escindir en subunidades que comprenden F_1 y F_2, y formas que carecen de la marca His C-terminal opcional. Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos del alcance de la presente invención y por lo tanto no se proponen para limitar de ningún modo el alcance.

Un ejemplo de la escisión de furina tipo silvestre es His truncado tipo silvestre de F de RSV (SEQ ID NO: 84).

Los ejemplos de polipéptidos que se pueden producir como monómeros incluyen: RSV F Furx (SEQ ID NO: 45); HIS truncado RSV F old furx (SEQ ID NO: 88); HIS truncado RSV F Furx R113Q K123N K124N (SEQ ID NO: 89), HIS truncado RSV F delp21 furx (SEQ ID NO: 47) y HIS truncado RSV F delP23 furx (SEQ ID NO: 48).

Los ejemplos de polipéptidos que se pueden producir

como trímeros incluyen: HIS truncado de furina N-términal de F de RSV (SEQ ID NO: 85); HIS truncado de supresión de fusión de F de RSV (SEQ ID NO: 67), y HIS truncado de supresión 2 de fusión de F de RSV (HIS SEQ ID NO: 68).

Los ejemplos de polipéptidos que se pueden producer como monómeros o rosetones de trímeros incluyen: HIS Truncado de RSV-F furmt (SEQ ID NO:50); HIS Truncado de RSV-F furdel (SEQ ID NO:51); HIS Truncado de RSV-F delP21 furdel (SEQ ID NO:86); y HIS Truncado de RSV-F delP23 furdel (SEQ ID NO:49), y HIS Truncado de Factor Xa de RSV-F (SEQ ID NO:52).

Un ejemplo de una escisión tipo Silvestre que produce probablemente un formación de roseta es HIS Truncado de Furina de RSV-F C-términal (SEQ ID NO:87).

Completo

El siguiente polipéptido es un polipéptido F de RSV de longitud completa.

```
  1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO: 21)
```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

```
   1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
  61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
```

1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACTGAAG (SEQ ID NO: 22)

HIS completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de RSV de longitud completa seguido por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNSGGSAG SGHHHHHH (SEQ ID NO: 23)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACAGCGGCGG CAGCGCCGGC
1741 TCTGGCCACC ACCACCATCA CCACTGAAG (SEQ ID NO: 24)

HIS pre completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de RSV de longitud completa con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) unido en el C-términal del polipéptido F de RSV seguido por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGRM KQIEDKIEEI LSKIYHIENE
601 IARIKKLIGE SGGSAGSGHH HHHH (SEQ ID NO: 25)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCCGGATG
1741 AAGCAGATCG AGGACAAGAT CGAGGAAATC CTGAGCAAGA TCTACCACAT CGAGAACGAG
1801 ATCGCCCGGA TCAAGAAGCT GATCGGCGAA AGCGGCGGCT CTGCCGGAAG CGGCCACCAC
1861 CACCATCACC ACTGAAG (SEQ ID NO: 26)

HIS 2 pre completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de RSV de longitud completa con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) unido al C-términal del polipéptido F de RSV seguido por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS

541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGSG RMKQIEDKIE EILSKIYHIE

601 NEIARIKKLI GESGGSAGSG HHHHHH (SEQ ID NO: 27)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG

241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAGCGGC
1741 CGGATGAAGC AGATCGAGGA CAAGATCGAG GAAATCCTGA GCAAGATCTA CCACATCGAG
1801 AACGAGATCG CCCGGATCAA GAAGCTGATC GGCGAAAGCG GCGGCTCTGC CGGAAGCGGC
1861 CACCACCACC ATCACCACTG AAG (SEQ ID NO: 28)

HIS ecto

El siguiente polipéptido incluye el ecto-dominio del polipéptido F de RSV seguido por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNSGG SAGSGHHHHH H
(SEQ ID NO: 29)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TAGCGGCGGC
1561 AGCGCCGGCT CTGGCCACCA CCACCATCAC CACTGAAG (SEQ ID NO: 30)

HIS pre ecto

El siguiente polipéptido incluye el ecto-dominio del polipéptido F de RSV con el dominio de trimerización de GCN4 (subrayado) insertado en el polipéptido F de RSV en la dirección 5' donde el dominio TM la proteína de REV se ha

seguido (empezando en a.a. 517) por una marca de hexa-histidina.

```
  1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNDKI EEILSKIYHI ENEIARIKKL
541 IGESGGSAGS GHHHHHH (SEQ ID NO: 31)
```

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

```
  1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
```

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGACAAGATC
1561 GAGGAAATCC TGAGCAAGAT CTACCACATC GAGAACGAGA TCGCCCGGAT CAAGAAGCTG
1621 ATCGGCGAAA GCGGCGGCTC TGCCGGAAGC GGCCACCACC ACCATCACCA CTGAAG

(SEQ ID NO: 32)

HA HIS pre completo

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de RSV de longitud completa con el dominio de trimerización de post-fusión del polipéptido de hemaglutinina de influenza (subrayado) unido en el C-términal del polipéptido F de RSV seguido por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGNE KFHQIEKEFS EVEGRIQDLE
601 KSGGSAGSGH HHHHH (SEQ ID NO: 33)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAATGAG
1741 AAGTTCCACC AGATCGAGAA AGAATTCAGC GAGGTGGAGG GCCGGATCCA GGACCTGGAA
1801 AAGAGCGGCG GCTCTGCCGG AAGCGGCCAC CACCACCATC ACCACTGAAG
(SEQ ID NO: 34)

HA HIS pre ecto

El siguiente polipéptido incluye el ecto-dominio del polipéptido F de RSV con el dominio de trimerización de post-fusión del polipéptido de hemaglitinina de influenza (subrayado) insertado en el polipéptido F de RSV en la dirección 5' de donde el dominio TM de la proteína de RSV se habría seguido (empezando en a.a. 517) por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNEKF HQIEKEFSEV EGRIQDLEKS
541 GGSAGSGHHH HHH (SEQ ID NO: 35)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

```
   1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
  61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGAGAAGTTC
```

1561 CACCAGATCG AGAAAGAATT CAGCGAGGTG GAGGGCCGGA TCCAGGACCT GGAAAAGAGC
1621 GGCGGCTCTG CCGGAAGCGG CCACCACCAC CATCACCACT GAAG (SEQ ID NO: 36)

completo△HRB HIS

El siguiente polipéptido incluye el polipéptido F de RSV de longitud completa con el dominio HRB suprimido seguido por la marca de hexa-histidina.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPNIMITTI
481 IIVIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNMGGSHH HHHH
(SEQ ID NO: 37)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA ATATCATGAT CACCACAATC
1441 ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC
1501 AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC
1561 GCCTTCTCCA ACATGGGGGG TTCTCATCAT CATCATCATC ATTGAAG (SEQ ID NO: 38)

ecto

El siguiente polipéptido incluye el ecto-dominio del polipéptido F de RSV.

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTN (SEQ ID NO: 39)

La siguiente secuencia de ácido nucleico es la secuencia codificadora optimizada para la secuencia de polipéptido extraña.

```
   1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
  61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
```

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG

1561 AGCACCACCA ATTGAAG (SEQ ID NO: 40)

RSV F Longitud completa

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL

SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA

KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN

GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT

TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL

YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK

NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF

DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLY

CKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO:41)

Enterocinasa de escisión de RSV-F idealizada

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL

SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA

KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN

GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT

TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL

YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK

NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF

DASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGDDDDDKGSGSGIMITTIIIV

IIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO:42)

Trombina de escisión de RSV-F idealizada

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGLVPRGSGSGIMITTIIIVII
VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO:43)

Factor Xa de escisión de RSV-F idealizado

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGIEGRGSGSGIMITTIIIVII
VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO:44)

HIS Truncado de RSV F furx

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN

GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:45)

HIS Truncado de RSV F furx R113Q, K123N, K124N

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
NNTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:46)

HIS Truncado de RSV F furx R113Q, K123Q, K124Q

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
QQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO:93)

HIS Truncado de RSV F delP21 furx

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN----------
QNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSK
VLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYML
TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT
LPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTF
SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVN
EKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:47) (El
símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está
suprimido)

HIS Truncado de RSV F delP23 furx

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN----------
QNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK

INQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:48) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)HIS TRUNCADO

HIS Truncado de RSV F delP23 furdel

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ----------
QQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
INQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:49) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

HIS Truncado de RSV F furmt

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARKELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKKKFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID

NO:50)

HIS Truncado de RSV F furdel

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKK---
RFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLK
NYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSEL
LSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT
SPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCD
YVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQ
SLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:51) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

HIS Truncado de Factor Xa de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNIEGRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKIEGRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:52)

HIS de Foldon de ligador corto de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLL
STFLGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:53)

HIS de Foldon de ligador Largo de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNNKNDDKGSGYIPEAPRDGQAYVRKD
GEWVLLSTFLGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:54)

RSV_F_ecto_pre_his

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL

SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAG
SGHHHHHH (SEQ ID NO:55)

ECTO PRE HA HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKSGGSAGSGHH
HHHH (SEQ ID NO:56)

RSV F ECTO Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
NNTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT

TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:57)

RSV F ECTO delp21 GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN---------
QNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSK
VLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYML
TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT
LPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTF
SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVN
EKINQSLAFIRKSDELLHNVN
DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:58) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

RSV F ECTO delp23 Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN---------
QNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK

LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
INQSLAFIRKSDELLHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHHH
(SEQ ID NO:59) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

RSV F ECTO delp23 Furdel GCN HIS

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ----------
QQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
INQSLAFIRKSDELLHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHHH
(SEQ ID NO:60) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

Furx de Longitud Completa de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
NNTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

(SEQ ID NO:61)

delp21 de Longitud Completa de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN---------
QNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSK
VLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYML
TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT
LPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTF
SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVN
EKINQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

(SEQ ID NO:62) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

p23 Furx GCN HIS de Longitud completa de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN---------
QNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP

SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
INQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

(SEQ ID NO:63) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

p23 Furdel GCN HIS de Longitud Completa de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ----------
QQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
INQSLAFIRKSDELLHNVN
AGKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

(SEQ ID NO:64) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

HIS Truncado de Furx de Furina N-terminal de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
QQTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL

YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO:65)

HIS Truncado de Furx de Furina N-terminal de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPQFMNYTLNNA
QQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO:66)

HIS Truncado de Supresión 1 de Fusión de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKV
LDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL
PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFS
NGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNE

KINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:67)

HIS Truncado de Supresión 2 de Fusión de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT
SKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTY
MLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDT
PCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNS
LTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIK
TFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQ
VNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:68)

HIS Truncado de Furx de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
QQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:69)

Furx Truncado de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA

QQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (SEQ ID NO:70)

<u>No HIS Truncado de delP23 furdel de RSV-F (para células CHO)</u>

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ----------
QQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVL
DLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTN
SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
SEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSN
GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEK
INQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (SEQ ID NO:71) (El símbolo “-“ indica que el aminoácido en esta posición está suprimido)

<u>HIS Truncado de RSV F (Wt)</u>

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:
84)

HIS Truncado de RSV F old furx

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELQRFMNYTLNNA
NNTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO:88)

HIS Truncado de Furx R113Q K123N K124N de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA
QQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID

NO:89)

HIS Truncado de Furina N-terminal de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPQFMNYTLNNA
QQTNVTLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO:85)

HIS Truncado de delP21 furdel de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ----------
QNQQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSK
VLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYML
TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPC
WKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT
LPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTF
SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVN
EKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:86)

HIS Truncado de Furina C-terminal de RSV-F

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNA

QQTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:87)

Ejemplo 2.- Expresión y Purificación de Construcciones de F de RSV

Las contracciones truncadas y de ectodominio de F de RSV, que carecen del dominio transmembrana y la región de extremo citoplásmico con ya sea sitios de escisión de furina tipo silvestre o que tienen mutaciones de supresión a los sitios de escisión de furina y con o sin mutaciones de estabilización de pre-fusión, se clonaron en un vector de expresión de baculovirus pFastBac (Invitrogen). Varias de estas construcciones contienen un ligador flexible C-terminal seguido por una secuencia de marca His usada para purificación por quelación. La producción de soluciones concentradas de baculovirus de alto título se pasaron en células insectiles Sf9. Las proteínas se expresaron al infectar ya sea células insectiles Sf9, Tn5 o High Five con el baculovirus requerido y recolectando el sobrenadante del medio dos o tres días después de la infección, monitorizado

por transferencia western usando anticuerpo anti-RSV-F o anti-6HIS.

El medio de expresión a grande escala se concentró/purificó por una de dos estrategias generales para eliminar el efecto perjudicial de la ferritina presente en medio de células insectiles de la corrupción de resina quelante. El primer planteamiento fue concentrar los aproximadamente 10-20 litros de medio de expresión insectil a aproximadamente 300 ml usando una columna de concentración de fibra GE Healthcare Hollotube. Se adicionó sulfato de cobre a esta mezcla concentrada a una concentración final de 500 µM y la solución resultante se cargó en columnas quelantes HiTrap de 5 ml. La proteína marcada con HIS unida, entonces se eluyó de la columna con Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

En la segunda estrategia de purificación, se adicionó $CuCl_2$ al sobrenadante del medio una concentración final de 500 µM. A cada litro de medio, se adicionaron cuatro mililitros de resina de quelación (Chelating Resin, BioRad) y la suspensión espesa se meció durante al menos treinta minutos a 4 grados centígrados y la resina y el medio se separaron por una columna de gravedad. La resina se lavó con diez veces el volumen de la columna de amortiguador de equilibrio (Tris 25 mM, pH 7.5, NaC1 300 mM) y la proteína F se eluyó con diez veces el volumen de la columna de

amortiguador de elución (amortiguador de equilibrio con imidazol 250 mM). La elución se analizó contra amortiguador Tris 25 mM, pH 7.5, y la solución resultante se cargó en una columna de quelación Hitrap de 5 ml con $NiSO_4$ y se eluyó con Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Se evaluaron las eluciones del gradiente de imidación en cualquier caso usando geles de coomassie y western anti-6HIS. Se recolectaron las fracciones que contienen construcciones pura, se dializaron contra diferentes soluciones de amortiguador/soluciones salinas y se concentraron para análisis subsiguiente usando concentradores Millipore Centriprep y/o unidades de concentración Vivaspin. También se desarrolló un protocolo de purificación por exclusión de tamaño capaz de purificar adicionalmente trímeros monodispersados de RSV de los rosetones (ver más adelante).

Análisis por SEC de Proteínas F de RSV:

Una característica documentada de otras proteínas de fusión de paramixovirus estabilizadas en su conformación de pre-fusión es que, aún cuando se escinden de modo que se expone el péptido de fusión, no forman rosetones como se observa para la conformación de post-fusión. Un análisis simple por cromatografía de inclusión de tamaño permite la identificación de una proteína en la determinación de sí una proteína está formando rosetones. Se desarrollaron dos

métodos, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también sirve como un paso eficiente de purificación.

Se realizó HPLC-SEC usando una columna Biorad SEC (18 mm) con Tris 25 mM, pH 7.5, fase móvil de NaCl 300 mM. Usando normas Biorad HPLC-SEC para calibrar el sistema, se encontró que los rosetones de RSV (que representan las conformaciones de post-fusión, escindidas) se eluyen en el volumen hueco de la columna del análisis, en tanto que los trímeros monodisperdados de RSV (trímeros presumidos de análisis de EM subsiguiente) eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa.

Se realizó FPLC-SEC en una FPLC GE Healtcare usando una columna 16/60 Superdex 200 con Tris 25 mM, pH 7.5, fase móvil de NaCl 300 mM. Usando normas de peso molecular alto GE Healthcare para calibrar el sistema, se encontró que los rosetones de RSV eluyen en el volumen hueco de la columna del análisis, en tanto que los trímeros monodispersados de RSV con un peso molecular aparente de aproximadamente 100 kDa.

Microscopía Electrónica (EM) de Proteínas F de RSV.

Soluciones de proteína de aproximadamente 50 microgramos por ml de construcciones de F de RSV se absorbieron en rejillas revestidas con carbono descargadas de brillo y se tiñeron negativamente con fosfotungstato de sodio al 2 % (pH 7.0) o Urynal-formiato al 0.75 % (pH bajo no cuantificado). Las rejillas se observaron en un microscopio

electrónico de transmisión Technai Spirit o JOEL 1230 que opera entre 80-120 kV con un aumento entre 20,000 a 150,000 dependiendo de la resolución requerida.

Tabla 2

Construcción	Conformación por EM
RSV F ECTO HIS	Predominantemente rosetones
RSV F Furdel ECTO (escindido)	Predominantemente rosetones
RSV F Delp23 Furdel Truncado (no escindido)	Trímeros observador
Supresión 1 de péptido de fusión de RSV-F, Truncado (no escindido)	Trímeros
RSV-F Delp23 Furdel Truncado (escindido por tripsina después de purificación)	Predominantemente rosetones con algunos trímeros
RSV F Delp23 Furdel Truncado (escindido por tripsina después de purificación en presencia de disco de nanolípido)	Rosetones asimétricos con disco de nanolípido aparente en el centro del rosetón

Ejemplo 3.- Detección de RSV-F de Pre-Fusión y Post-Fusión

Están disponibles varios métodos para determinar la conformación de la proteína F de RSV para valorar si una modificación al polipéptido F de RSV o molécula adicionada desfavorece la conformación de post-fusión. Los ejemplos incluyen asociación de liposoma, anticuerpos monoclonales específicos de la conformación (incluyendo como se usa en FACS, ELISA, etc.), microscopía electrónica, sensibilidad de

proteasa diferencial entre las conformaciones, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración analítica, dispersión de luz dinámica, experimentos de RMN de intercambio de deuterio, espectroscopia de masa, espectroscopia de dicroismo circular, calorimetría de titulación isotérmica, espectroscopia con triptófano y cristalografía de rayos X.

Asociación de Liposoma

Se puede usar asociación de liposoma para valorar la conformación de la proteína F de RSV. Las formas solubles de la proteína F de RSV en la conformación de pre-fusión no se asociarán con liposomas en tanto que la conformación de post-fusión se asociará con liposomas.

Se pueden preparar liposomas como sigue: se mezclan 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, y colesterol en cloroformo (disponibles de Avanti Polar Lipids) a una relación molar de 8:2:5. El cloroformo se evapora bajo argón. Una película de lípido se formará que se seca bajo vacío durante la noche y se re-suspende en PBS a lípidos totales de 40 mM. Después de cinco ciclos de congelación-descongelación, los lípidos se someten a vórtice y se extruyen 21 veces a través de dos filtros de 100-µm al usar un miniestrusor (disponible de Avanti Polar Lipids).

Una vez que se han preparado los liposomas, el ensayo de asociación de liposoma se puede realizar. Para cada

muestra que se va a probar, se escinden 2 µg del polipéptido F de RSV a probar con 25 miliunidades de tripsina (disponible de Worthington Biochemical) en amortiguador de fosfato 100 mM (pH 7.1) durante 30 minutos a 25°C. Después de la escisión, se adicionan 40 pg de inhibidor de tripsina de soya (disponible de Worthington Biochemical) a cada muestra para terminar la reacción. Las muestras se pre-tratan a 60°C durante 30 minutos con lo que se inducirá un cambio conformacional de las formas de pre-fusión a la de post-fusión en la proteína F de RSV, aislada, nativa. Se adicionan liposomas (40 µl por muestra) y PBS (80 µl de volumen final), y las muestras se incuban a 60°C durante 30 minutos. Se adiciona sacarosa a una concentración final de 50 % (volumen final de 500 µl). Las muestras se revisten con 500 µl de cada uno de sacarosa al 40 %, sacarosa al 25 %, y PBS y se centrifugan en un rotor TLS55 a 49,000 rpm durante 3 horas a 25°C. Se recolectan fracciones (500 µl) de la parte superior de los gradientes. Las proteínas se solubilizan en Triton X-100 al 0.5 % y se precipitan al usar ácido tricloroacético al 12.5 % vol/vol. Los polipéptidos se separan por SDS/PAGE y se transfieren a membranas de PVDF. Las transferencias se sondean con anticuerpos monoclonales anti-RSV-F.

Microscopía Electrónica

Se usó microscopía electrónica para valorar la distribución conformacional de polipéptidos F de RSV. Los

polipéptidos F de RSV en la forma de pre-fusión tienen una forma de “bola y tallo” con una longitud de ~12nm. En contraste, los polipéptidos F de RSV en la forma de post-fusión tienen una forma de “palo de golf” con una longitud de ~16 nm. Además, los polipéptidos de fusión en el extremo estrecho del “palo de golf” se agregan para formar estructuras de rosetones. De esta manera, se puede usar microscopía electrónica para valorar la distribución de las conformaciones en una muestra de polipéptidos F de RSV debido a las formas fácilmente distinguibles.

Ejemplo 4.- Trímeros y Rosetones de Ectodominio F de RSV

Las construcciones de ecto-dominio de proteína F de RSV, que codifican para polipéptidos que carecen del domino transmembrana y la región de extremidad citoplásmica con ya sea sitios de escisión de furina tipo silvestre o que tienen mutaciones de supresión a los sitios de escisión de furina y/o mutaciones de péptido de fusión, se clonaron en un vector de expresión de baculovirus pFastBac (Invitrogen). Varias de estas construcciones contienen un ligador flexible C-terminal seguido por una secuencia de marca HIS_6 usada para purificación por quelación. La producción de soluciones concentradas de baculovirus de alto título se obtuvo por el paso en células insectiles Sf9. Se expresaron proteínas al infectar ya sea células insectiles Sf9, Tn5 o High Five con el baculovirus requerido y recolectando el sobrenadante de

medio acondicionado dos o tres días después de la infección. Se monitorizó la producción de proteína por transferencia western usando un anticuerpo anti-RSV-F o anti-HIS_6.

El medio de expresión a gran escala se concentró/purificó usando una de dos estrategias generales para eliminar el efecto perjudicial de la ferritina presente en medio de células insectiles, que puede corromper la resina quelante. El primer planteamiento fue concentrar los aproximadamente 10-20 litros de medio de expresión de insecto hasta aproximadamente 300 ml usando una columna de concentración de fibra GE Healthcare Hollotube. Se adicionó sulfato de cobre a esta mezcla concentrada a una concentración final de 500 µM, y la solución resultante se cargó en columnas quelantes HiTrap de 5 ml. La proteína marcada con HIS, unida, entonces se eluyó de la columna con Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

En la segunda estrategia de purificación, se adicionó $CuCl_2$ al sobrenadante de medio a una concentración final de 500 µM. A cada litro de medio, se adicionaron aproximadamente cuatro a diez mililitros de resina quelante (Chelating Resin, BioRad), y la suspensión espesa se meció durante al menos treinta minutos a 4 grados centígrados, y la resina y el medio se separaron usando una columna de gravedad. La resina se lavó con aproximadamente diez veces el volumen de columna de amortiguador de equilibrio (Tris 25 mM,

pH 7.5, NaCl 300 mM), y el ecto-dominio de proteína F se eluyó con aproximadamente diez veces el volumen de columna de amortiguador de elución (amortiguador de equilibrio con imidazol 250 mM). La elución se dializó contra amortiguador Tris 25 mM, pH 7.5, y la solución resultante se cargó en una columna de quelación Hitrap de 5 ml cargada con $NiSO_4$. La proteína unida se eluyó con Tris 25 m, pH 7.5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Las eluciones del gradiente de imidazol en cualquier caso se eluyeron usando transferencias western anti-HIS_6 y/o geles SDS-PAGE teñidos con coomassie. Se recolectaron las fracciones que contienen construcciones puras, se dializaron contra diferentes soluciones amortiguadoras/salinas y se concentraron para análisis subsiguiente usando concentradores Millipore Centriprep y/o unidades de concentración Vivaspin. En algunos casos, los monómeros, trímeros o rosetones se purificaron adicionalmente usando cromatografía de exclusión de tamaño. Análisis por SEC y Purificación de Ecto-dominios F de RSV

Se usó cromatografía de exclusión de tamaño para purificar y analizar monómeros, trímeros y rosetones de ecto-dominio de proteína F de RSV. Este método también permitió que los ecto-dominio no escindidos de proteína F de RSV se purificaran de la célula hospedadora o de los contaminantes de lípido y lipoproteína derivados del medio. Se

desarrollaron dos métodos, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también pueden servir como un paso eficiente de purificación.

Se realizó HPLC-SEC usando una columna Biorad SEC (18 mm) con Tris 25 mM, pH 7.5, fase móvil de NaCl 300 mM. Usando normas Biorad HPLC-SEC para calibrar el sistema, se encontró que los rosetones de RSV (que representan conformaciones de post-fusión, escindida) eluyen en el volumen hueco de la columna del análisis, en tanto que los monómeros de RSV-F eluyen con un peso molecular aparten de aproximadamente 75-85 kDa.

Se realizó FPLC-SEC en FPLC GE Healthcare usando una columna 16/60 Superdex 200 con Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM, como una fase móvil. Usando normas de alto peso molecular de GE Healthcare para calibrar el sistema, se encontró que los rosetones de RSV el eluyen en el volumen hueco de la columna del análisis, en tanto que los trímeros monodispersados de RSV eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 140-160 kDa y los monómeros de F de RSV eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa.

Para la purificación se uso el método de FPLC-SEC y se recolectaron fracciones de de 1 ml.

Escisión con Tripsina de Construcciones Furdel o Delp23 Furdel Para Formar Rosetones de Post-Fusión

En general, la digestión con tripsina de monómeros

de Delp23 Furdel se hizo con tripsina: RDV-F 1:1000 en peso, o 10-15 unidades BAEE de tripsina por 1 mg de antígeno de RSV-F. En una reacción típica, se diluyo tripsina de plasma bovino (Sigma Aldrich, T8802: 10,000-15,000 unidades BAEE/mg de tripsina) a una concentración de 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM. Una solución de 1 mg/ml de polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV (diluido en Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM) se trató con un microlitro de solución de tripsina (relación final en masa tripsina:RSV-F 0.001:1 o aproximadamente 10-15 unidades BAEE de tripsina a cada miligramo de RSV-F) durante 1 hora a 37°C. Típicamente, el progreso de la reacción de escisión se monitorizó por gel de SDS-PAGE. La reacción de escisión se detuvo usando un inhibidor de tripsina. La proteína F escindida de RSV se purificó adicionalmente por cromatografía de exclusión de tamaño.

En la ocasión, se adicionó un volumen 1:100 de inhibidor inmovilizado de tripsina (Sigma) o 1 microlitro de inhibidor de tripsina de soya 1 mM a la solución de escisión y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-30 minutos con balanceo suave para detener la reacción de tripsina. La resina de inhibidor se separó de la solución de proteína usando columna semi-centrífuga. La solución resultante se purificó por purificación de SEC.

Microscopia Electrónica (EM, por sus siglas en inglés) de Proteínas F de RSV.

Los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV (aproximadamente 50 microgramos por ml), se absorbieron en rejillas revestidas con carbón descargadas de brillo y se tiñeron negativamente con fosfotungstato de sodio al 2 % (pH 7.0) o uranil-formiato al 0.75 % (pH bajo no cuantificado). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Technai Spirit or JOEL 1230 que opera entre 80-120 kV con un aumento entre 20,000 a 150,000 dependiendo de la resolución requerida.

Ensayo de Fosfolípido

Este ensayo se basa en el método de ensayo de fosfolípidos C-colina-oxidasa-DAOS de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Cat. No 433-36201). El protocolo de ensayo se modifica sólo para reducir la cantidad de material usado en el ensayo, y para disminuir la dilución de muestra en la reacción con relación al protocolo general del vendedor. Para determinar el contenido de lípido de la muestra de RSV-F, para generar el reactivo de color al disolver una botella de reactivo de color con una botella de amortiguador (reactivo de color es estable durante 1 semana a 4°C). Se diluyen 300 mg/dL (3 mg/ml) de norma de fosfolípido a 1.5, 1.0, 0.75, 0.5 y 0.25 mg/ml con agua destilada. Para cada norma, una muestra en blanco de agua y la reacción de muestra, adicionar a un tubo de microcentrífuga 10 µl de reactivo de color y 2 µl de ya sea norma, agua destilada (0 mg/ml de norma) o muestra.

Centrifugar las reacciones brevemente para asegurar el mezclado apropiado e incubar los tubos durante 15 minutos a 37°C. Registrar la absorbancia a 595 nm para cada punto de norma y generar una curva de norma. Registrar la absorbancia a 595 nm para cada muestra y calcular la concentración de fosfolípidos a partir de la curva de calibración preparada.

Inmunogenicidad en Ratas de Algodón

La inmunogenicidad de los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV en las formas de monómeros (no escindido delp21 furx), rosetones de trímeros (escindido delp23 furdel), y trímeros (supresión de péptido de fusión) se determinaron en ratas de algodón (Sigmodon hispidus) en dos estudios. En el estudio 1 (Figuras 8A y 8B), se vacunaron 10 ratas de algodón por grupo de forma intramuscular con 10 µg de monómeros o rosetones (cada uno adsorbido a hidróxido de aluminio) en los días 0 y 21. Se midieron los títulos en suero de anticuerpo neutralizantes de RSV e IgG anti-proteína F de RSV-F 2 semanas después de la primera vacunación (2wp1) y 2 semanas después de la segunda vacunación (2wp2), o 3 semanas después de la primera vacunación (3wp1) y 2 semanas después de la segunda vacunación (2wp2). Se determinó la IgG anti-proteína F de RSV (Figura 8A) por ELISA usando placas revestidas con proteína F de RSV y anticuerpo de detección de anti-IgG de rata de algodón, de pollo, conjugado con peroxidasa de rábano. Los datos se presentan como títulos

medios geométricos log_{10} (GMT, por sus siglas en inglés) + desviaciones estándar de ratas de algodón individuales. Se midieron títulos de neutralización de RSV (Figura 8B) por prueba de neutralización de reducción de placa (PRNT, por sus siglas en inglés). En resumen, las diluciones de suero inactivado térmicamente se pre-incubaron con Long de RSV, y luego se inocularon en células HEp-2 en placas con 12 concavidades. Después de una infección de 2 horas, se removió el inoculo y las células se revistieron con agarosa. Las placas se enumeraron 5 días después por tinción de rojo neutral. El título de neutralización se define como lo recíproco de la dilución en suero que produce al menos una reducción de 60 % en el número de placas por concavidad, con relación a controles (sin suero). Los datos se presentan como log_{10} GMT + error estándar de 2 mezclas de 5 ratas de algodón por grupo.

En el estudio 2 (Figura 8C), se inmunizaron 9 ratas de algodón por grupo intramuscularmente con las dosis indicadas de monómeros, trímeros o rosetones, (cada uno adsorbido a hidróxido de aluminio). Se midieron los títulos en suero de IgG anti-proteína F de RSV 2wp1 como antes.

Resultados

El ecto-dominio F de RSV soluble (con sitios de escisión de furina no mutados), se expresó, pero no se puede purificar de impurezas de lípidos y lipoproteínas derivadas

de las células hospedadoras o medio de cultivo usando cromatografía de exclusión de tamaño. Estos polipéptidos de ecto-dominio F de RSV eluyen en el volumen hueco de la columna de SEC junto con los contaminantes de lípidos y lipoproteínas.

Se prepararon varias construcciones para producir polipéptidos de ecto-dominio F de RSV que contienen mutaciones a los sitios de escisión de furina, incluyendo las construcciones Furdel. Ver, Figura 1. Los polipéptidos producidos por la expresión de las construcciones Furdel se segregaron de las células como una especie no escindida de ~65 kDa. La mutación Furdel también impide la exposición del péptido de fusión, que a su vez impide la formación de rosetones. Como resultado, Furdel de F de RSV soluble migró en el volumen incluido de una columna preparatoria Superdex 200, dando por resultado la separación de ambos desechos de lípidos, que eluyó en el volumen hueco, e impureza de proteína insectil. Estos resultados muestran que los polipéptidos de ecto-dominio F de RSV en los cuales se han mutado los sitios de escisión de furina se producen como polipéptido no escindido que se puede purificar por SEC. Además, el análisis del tiempo de retención de RSV-F no escindido fue consistente con los polipéptidos que son monómeros en lugar de trímeros.

Si los polipéptidos de Furdel F de RSV fueron

monómeros, trímeros o una mezcla de monómeros y trímeros se valoró usando adicionalmente ultracentrifugación analítica. Se realizaron estudios de ultracentrifugación analítica usando por rutina purificada del pico de monómero de la purificación por SEC. Los datos de velocidad de sedimentación de la RSV-F no escindida mostraron un patrón de pasos que sugieren dos especies en solución. El análisis del experimento de velocidad de sedimentación mostró que el ecto-dominio de RSV-F no escindido que tienen una alta población de monómero y una menor población de trímero aparente en la solución. Se recolectaron los datos de corrida de equilibrio y se realizaron intentos para ajustar los datos a ya sea un modelo ideal de monómero o un modelo de equilibrio de monómero-trímero. Sin embargo, son pobres los residuales de los ajustes, particularmente hacia el fondo de la celda donde es mayor la concentración de proteína. Estas observaciones sugirieron que los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio F de RSV son predominantemente un monómero con una población más pequeña que se auto-asocia (potencialmente como trímeros) o se agrega a mayores concentraciones.

Se llevó a cabo el análisis adicional de polipéptidos seleccionados de ecto-dominio de proteína F de RSV usando cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Figuras 6A-6D. Los picos principales que contienen monómeros,

trímeros, o rosetones de trímeros se indican por un asterisco en las Figuras 6A-6D, con el tiempo de retención de la columna Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) se indica en mililitros. En una columna calibrada, los tiempos de retención aproximados de 47 mls, 65 mls y 77 mls corresponden al volumen hueco de columna, la retención de trímeros F y la retención de los monómeros, respectivamente. En la Figura 6A, la construcción Delp23 Furdel (Ap23 Furdel) no escindida se purificó del pico de monómero. Cuando el antígeno F de RSV, Delp23 Furdel no escindido se trató con tripsina, la proteína formó rosetones que migraron en SEC en el volumen hueco (Figura 6B). Las especies de trímeros escindidos de la supresión de péptido de fusión de F de RSV se purificaron del pico de trímero en aproximadamente el tiempo de retención de 65 mls (Figura 6C) en tanto que la construcción Delp21 Furx no escindida (Δp21 Furx) se purificó del pico de monómero en aproximadamente 77 mls (Figura 6D).

Varios polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV en la forma no escindida o después de la escisión con tripsina se valoraron por EM. Las construcciones Furdel y delp23 de RSV-F tienen residuos de arginina que permanecen en el sitio de escisión de furina. Estas argininas son susceptibles

a escisión con tripsina. En la escisión, las especies F_0 no escindidas se convirtieron a las especies F_1/F_2, en las cuales se expone el péptido de fusión. El análisis por EM confirmó que después de la escisión con tripsina, los ecto-dominios no escindidos de RSV formaron rosetones de trímeros en virtud de sus péptidos de fusión, como se ha observado para proteínas de fusión relacionadas. Los resultados se presentan en la Tabla 3, y muestran que los polipéptidos no escindidos de ecto-dominio de proteína F de RSV se pueden escindir para formar rosetones de trímeros. La construcción suprimida de péptido de fusión, que se escinde por furina, formó trímeros monodispersados. Ver también Figuras 7A-7D. De manera ventajosa, la producción de rosetones de trímeros de esta manera da por resultado rosetones de trímeros que están sustancialmente libres de desechos de lípidos y lipoproteínas.

Los resultados de los estudios de inmunogenicidad mostraron que los polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV en la forma de monómeros (delp21 furx no escindidos), rosetones de trímeros (delp23 furdel escindido), y trímeros (supresión de péptido de fusión) fueron inmunogénicos en ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*), e indujeron

anticuerpos neutralizantes. Figuras 8A-8C.

Tabla 3

Construcción	Conformación por EM
Ecto-dominio tipo silvestre de RSV-F (escindido en célula hospedadora durante expresión)	Rosetones de trímeros asociados con desechos de lípidos
Furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado no escindido)	Variable. Algunas preparaciones muestran trímeros monodispersados; otras muestran poco material visible por EM de material negativamente teñido
Furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado, escindible con tripsina después de purificación)	Rosetones de trímeros
delp23 furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado - no escindido)	Variable. Algunas preparaciones muestran trímeros monodispersados; otras muestran poco material visible por EM de material negativamente teñido
delp23 Furdel escindible con tripsina (pico de monómero purificado, escindible con tripsina después de purificación)	Rosetones de trímeros

Construcción	Conformación por EM
Supresión de péptido de fusión escindida (pico de monómero purificado)	Trímeros monodispersados

Ejemplo 5 – Métodos para producir Antígenos de Sub-Unidad de RSV-F en Células Insectiles o CHO

Purificación de Antígeno de RSV-F de Células Insectiles:

Las subunidades de ectodominio de RSV-F, que incluye las construcciones De1p21 Furx, De1p23 Furdel y de supresión de péptido de fusión, se expresaron en células insectiles HiFive (Invitrogen) usando el sistema de baculovirus pFAST Bac. La subunidad de RSV-F se purificó de expresiones a gran escala, 10-25 litros, mediante un método de quelación de dos pasos que redujo el efecto perjudicial del contaminante de ferritina presente en el medio de células insectiles, que puede corromper la resina quelante. Ase adicionó $CuSO_4$ al sobrenadante del medio a una concentración final de 500 µM. Se adicionaron aproximadamente de diez a veinte mililitros de resina quelante (Chelating Resin, BioRad) a cada litro de medio, la suspensión espesa se meció durante al menos treinta minutos a 4°C, y la resina y el medio se separaron usando una columna de gravedad. Las resina se lavó con aproximadamente dos veces el volumen de resina de amortiguador de equilibrio (Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM),

y el ecto-dominio de proteína F se eluyó con aproximadamente dos veces el volumen de columna de amortiguador de elución (amortiguador de elución con imidazol 250 mM). La elución se dializó con amortiguador Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM y la solución resultante se cargó en una columna de quelación Hitrap de 5 ml cargada con $NiSO_4$ (GE Healthcare). Se eluyó la proteína unida con Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM y un gradiente de imidazol.

Las eluciones del gradiente de imidazol en ambos casos se eluyeron usando transferencias western anti-HIS_6 y/o geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Las fracciones que contienen construcciones puras se recolectaron y concentraron a aproximadamente 1 mg/ml usando concentradores Millipore Centriprep y/o unidades de concentración Vivaspin para análisis/purificación subsiguiente por cromatografía en exclusión de tamaño.

Análisis por SEC y Purificación de Ectodominios de RSV-F

Se usó cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) para purificar y analizar trímeros escindidos y monómeros no escindidos de ectodominio de proteína F de RSV. Este método también permitió que los ectodominios no escindidos de proteína F de RSV se purificaran de la célula hospedadora o de los contaminantes de lípidos y poliproteínas derivados del medio. En el caso en la generación de rosetones limpios, la construcción Delp23

Furdel no escindida se purificó inicialmente como un monómero y subsiguientemente en la proteasa se trató y re-purificó usando SEC para purificar los rosetones homogéneos (ver posteriormente). Se desarrollaron dos métodos para el análisis de la oligomerización de RSV-F, HPLC-SEC y FPLC-SEC, que también puede servir como un paso eficiente de purificación.

Se realizó HPLC-SEC usando una columna Biorad SEC (18 mm) con fase móvil de Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM. Usando normas Biorad HPLC-SEC para calibrar el sistema, se encontró que los rosetones de RSV (que representan conformaciones de post-fusión, escindidas) eluyen en el volumen huevo de columna del análisis en tanto que los monómeros de RSV-F eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa.

Se realizó FPLC-SEC en una FPLC GE Healthcare usando una columna 16/60 Superdex 200 con Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 300 mM como una fase móvil. Usando normas de alto peso molecular de GE Healthcare para calibrar el sistema, se encontró que los rosetones de RSV eluyen en el volumen hueco de la columna de análisis, en tanto que los trímeros monodispersados de RSV se eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 140-160 kDa y los monómeros de RSV F eluyen con un peso molecular aparente de aproximadamente 75-85 kDa. Para la purificación Delp21 Furx o

Delp23 Furdel (monómeros) no escindidos de RSV o supresión de péptido de fusión (trímero), se cargó 0.5-2 mls de aproximadamente 1 mg/ml de material purificado por quelación sobre una columna Superdex P200 16/60 equilibrada con una velocidad de flujo entre 0.5-2 mls/min y se recolectaron las fracciones pertinentes.

Escisión con Tripsina de Construcciones Delp23 Furdel para Formar Rosetones de Post-Fusión

La tripsina de plasma bovino (Sigma Aldrich, T8802: 10,000-15,000 unidades BAEE/mg de tripsina mg) se diluyó a una concentración 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM. Una solución de 1 mg/ml polipéptido de ecto-dominio de proteína F de RSV (diluido en Tris 25 mM, pH 7.5, NaCl 300 mM) se trató con un microlitro de solución de tripsina (relación de masa final tripsina: RSV-F 0.001:1 o aproximadamente 10-15 unidades BAEE de tripsina a cada miligramo de RSV-F) durante 1 hora a 37°C. El progreso de la reacción de escisión se monitoreó por gel SDS-PAGE. La reacción de escisión se detuvo usando inhibidor de tripsina (Inhibidor de Tripsina de Soya Gibco usando una masa igual de inhibidor a tripsina). Se encontró que se requiere un período de incubación entre el paso de escisión y la purificación subsiguiente de rosetones para permitir una mayor eficiencia de conversión de monómero a rosetón. Se dio un período de incubación de unas 6 horas a 37ºC para proporcionar mayor

eficiencia de formación de rosetones. La proteína F de RSV escindida se purificó adicionalmente de especies monoméricas no convertidas, usando cromatografía de exclusión de tamaño (como se describe anteriormente) donde se puede recolectar rosetones homogéneos en las fracciones del volumen hueco de columna.

Purificación de Antígeno de RSV-F de Células CHO:

Construcciones de supresión de péptido de fusión de RSV-F, que no contienen una marca HIS, se purificaron por purificación catiónica. El material de CHO que contiene antígeno de trímero de RSV-F expresado se concentró a aproximadamente un décimo del volumen original en un sistema de centrifugación de cartucho de fibra hueca de GE Healthcare (MWCO 10,000 kDa). La solución concentrada entonces se intercambio con amortiguador cuatro veces con un volumen equivalente de acetato de sodio 25 mM, pH 6.0, NaCl 25 mM. La solución resultante, que contiene trímero de RSV-F concentrado en el amortiguador de acetato/solución salina, se cargó en una columna de GE Healthcare HiTrap CM pre-cargada que se ha puesto en equilibrio con amortiguador de acetato/solución salina. La proteína se eluyó de la columna usando un gradiente gradual de amortiguador de acetato 25 mM que contienen ya sea NaCl 25, 150, 250, 500 o 1000 mM (las fracciones de NaCl de 250 mM y 500 mM que contienen el volumen del material eluido). Este material se puede purificar adicionalmente usando purificación por SEC similar

al protocolo anterior.

Ejemplo 6 - Inmunogenicidad de Subunidades de RSV-F en Ratas de Algodón

La inmunogenicidad y capacidad protectoras de las subunidades de trímero (RSV-F-fusión-péptido-supresión-trunc) y rosetón (RSV-F-delp23-furdel-trunc, escindido de RSV-F), cada una formulada con alumbre o MF59, se evaluó en el modelo de rata de algodón. El antígeno usado para ELISA fue RSV-F-fusión-péptido-supresión-trunc (Tabla 4). La neutralización fue contra RSV infeccioso, Cepa Long (Tabla 5). Todas las combinaciones fueron inmunogénicas, produciendo respuesta de anticuerpos neutralizantes RSV-F e IgG específica de RSV-F de alto título que se reforzaron por una segunda vacunación, y dio protección de estimulo nasal con RSV.

Métodos

Vacunación y Estímulo de Ratas de Algodón

Se obtuvieron ratas de algodón hembras (*Sigmodon hispidis*) de Harlan Laboratories. Los grupos de animales se inmunizaron de manera intramuscular (i.m. 100 μl) con las vacunas indicadas en los días 0 y 21. Las muestras de suero se recolectaron 3 semanas después de la primera inmunización (3wp1) y 2 semanas después de la segunda inmunización (2wp2). Los animales de control inmunizados o no vacunados se estimularon intranasalmente (i.n.) con $1x10^5$ ufp RSV Long 4 semanas después de la inmunización final. Se realizó la

recolección de sangre y la estimulación con RSV bajo anestesia con isoflurano al 3 % usando un vaporizador de precisión.

ELISA Específico de RSV-F

Se valoraron muestras individuales de suero para la presencia de IgG específicas de RSV-F por ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Las placas de ELISA (MaxiSorp de 96 concavidades, Nunc), se revistieron durante la noche a 4ºC con 1 μg/ml de RSV-F purificada (fusión-péptido-supresión-trunc) en PBS. Después del lavado (PBS con Tween-20 al 0.1 %), las placas se bloquearon con amortiguador de bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1.5 horas a 37ºC. Las placas entonces se lavaron, las diluciones en serie del suero en diluyente de ensayo (PBS con 0.1 % de Tween-20 y 5 % de suero de cabra) de ratas de algodón experimentales o de control se adicionaron, y las placas se incubaron durante 2 horas a 37ºC. Después del lavado, las placas se incubaron con IgG anti-rata de algodón, de pollo, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluida 1:5000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37ºC. Finalmente, las placas se lavaron y se adicionó a cada concavidad 100 μl de solución de sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Las reacciones se detuvieron por la adición de 100 μl

de H_3PO_4 1M, y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placa. Para cada muestra de suero, se generó una gráfica de densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) versus logaritmo de la dilución en suero reciproca por regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución en suero recíproca a un OD de aproximadamente 0.5 (normalizado a una norma, sueros mezclados de ratas algodón infectadas con RSV con un título definido de 1:2500, que se incluyó en cada placa).

Ensayo de Microneutralización

Se probaron muestras de suero para la presencia de anticuerpos neutralizantes por ensayo de microneutralización. Se adicionaron diluciones en serie de dos veces de suero inactivado térmicamente (HI, por sus siglas en inglés), (en PBS con suero bovino fetal –HI al 5 % (FBS, por sus siglas en inglés)) a un volumen igual de RSV, cepa Long previamente titulado para dar aproximadamente 115 PFU/25 μl. Se incubaron mezclas de suero/virus durante 2 horas a 37ºC y CO2 al 5 %, para permitir que se presente la neutralización del virus, y luego se inocularon 25 μl de esta mezcla (que contiene aproximadamente 115 PFU) en concavidades duplicadas de células HEp-2 en placas de 96 concavidades. Después de 2 horas a 37º y CO2 al 5 %, las células se revistieron con 0.75 % de metil-celulosa/EMEM 5 % HI-FBS y se incubaron durante 42 horas. El número de partículas infecciosas de virus se

determinó por detección de la formación de sincitios por inmunotinción seguido por conteo automatizado. El título de neutralización se define como lo recíproco de la dilución de suero que produce al menos una reducción de 60 % en el número sincitios por concavidad, con relación a controles (sin suero).

Carga Viral

La carga viral en el pulmón se determinó por ensayo de placa. Específicamente, se recolectaron los pulmones cinco días después de la infección con VRS y se colocó un lóbulo derecho en medio Eagle modificado de Dulbecco 2.5 ml (DMEM, Invitrogen) con sacarosa al 25 % y se interrumpió con un homogeneizador de tejido. Los sobrenadantes libres de células de estas muestras se almacenaron a -80ºC. Para valorar las infecciones de virus, las diluciones de homogenado pulmonar clarificado (en PBS con 5 % de HI-FBS) se inocularon en monocapas confluentes de células HEp-2 en un volumen de 200 µl/concavidad de una placa de 12 concavidades. Después de 2 horas con balance suave periódico (37ºC, CO2 al 5 %), se removió el inoculo y las células se revistieron con 1.5 ml de agarosa SeaPlaque al 1.25 % (Lonza) en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Lonza) complementado con 5 % HI-FBS, glutamina y antibióticos. Después de 3-4 días de incubación, nuevamente las células se revistieron con 1 ml de agarosa al 1.25 % en EMEM (Sigma) que contiene 0.1 % de rojo neutral (Sigma). Las placas se contaron un día después con la ayuda

de una caja de luz.

Un método alternativo para determinar la carga viral es PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). La carga viral se puede determinar por qRT-PCR usando cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen de RSV-F como se describe (I. Borg et al, *Eur Respir J* 2003; 21:944-51) con algunas modificaciones. Brevemente, se aísla el ARN de 140 μl de homogenado pulmonar clarificado, o de un número conocido de unidades formadoras de placa (PFU, por sus siglas en inglés) de RSV (determinado por ensayo de placa, y diluido en homogenado pulmonar de animales no infectados), usando el equipo RNeasy (Qiagen) con un volumen final de elución de 100 μl de H_2O. La síntesis de ADNc y la PCR se realizan en un tubo individual usando el equipo de RT-PCR cuantitativa de un paso SuperScript III Platinum (Invitrogen) con 5 μL de ARN eluido, 10 μM de cada cebador, y 50 μM de la sonda (cebadores y sondas de Integrated DNA Technologies). Cebador directo: TTGGATCTGCAATCGCCA (SEQ ID NO: 72). Cebador inverso: CTTTTGATCTTGTTCACTTCTCCTTCT (SEQ ID NO: 73). Sonda: 5'-carboxifluoresceína (FAM)-TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCTGCACT-tetrametilcarboxirodamina (TAMRA) -3'(SEQ ID NO: 74). Se realiza la amplificación y detección con ABI Prism 7900HT o 7500 (Applied Biosystems). Un valor de ciclo de umbral (Ct) se define para cada muestra como el número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia llega a ser primero detectable por arriba de

un umbral establecido. Entonces se determinan los equivalentes de PFU para cada muestra en base a una curva normal de Ct versus el logaritmo el número de copias definido de ARN viral.

Resultados

La rata de algodón como un modelo se ha usado extensivamente en el estudio de inmunidad y patogénesis de RSV debido a mucha similitudes entre la enfermedad inducida por RSV por ratas de algodón y humanos. Dos paralelos importantes son la eficiencia de los anticuerpos neutralizantes, y la histopatología pulmonar mejorada asociada con vacunación de RSV inactivado con formalina. Las ratas de algodón también son más susceptibles a infección de RSV que otros animales pequeños tal como ratones.

Para evaluar la inmunogenicidad de presentes vacunas de subunidades de RSV-F, se vacunaron grupos de ratas de algodón hembras intramuscularmente con varias dosis de trímeros (RSV-F-fusión-péptido-supresión-trunc) o rosetones (VSR-F-delp23-furdel-trunc, escindido), cada uno formulado con ya sea alumbre o MF59. En todos los casos, una inmunización individual fue suficiente para inducir anticuerpos neutralizantes como específicos de F en el suero cuando se midió tres semanas después de la primera vacunación (3wp1). A todas las ratas de algodón se les da una inmunización de refuerzo homologa tres semanas después de la primera, y esto dio por resultado un incremento significativo

en el anticuerpo neutralizante IgG específica de F cuando se miden dos semanas después (2wp2). En general, la inmunogenicidad de los rosetones fue igual a o mayor que aquella de los trímeros, la formulación de MF59 mejoró los títulos más que la formulación de alumbre, y las mayores dosis de proteína produjeron mayores títulos, aunque hubo algunas excepciones.

Para determinar la capacidad protectora de las vacunas de subunidades, todas las ratas de algodón se infectaron cuatro semanas después de la segunda vacunación con RSV por ruta nasal y la carga viral en el pulmón se midió cinco días después por ensayo de placa. En todos los casos, la vacunación de subunidades confirió protección de la estimulación, puesto que las cargas virales pulmonares en las ratas de algodón vacunadas fueron mayores que tres órdenes de magnitud menor que los animales no inmunizados, pero estimulados de control.

Tabla 4: Títulos en suero de IgG específicas de F

		Título[a] en suero de IgG específico de F			
		alumbre		MF59	
Suero recolectado	Dosis de proteína (µg)	trímero	rosetón	trímero	rosetón
3wp1	10	20276	36841	10251	22415

	1	18341	20802	3712	28610
	0.1	2698	6896	1065	8293
2wp2	10	103670	97174	130016	156144
	1	142331	102405	177441	299501
	0.1	11581	34354	50238	111099

[a]título medio geométrico para ratas de algodón individuales (7-8 por grupo)

inmunógeno de trímero fue RSV-F-fusión-péptido-supresión-trunc

inmunógeno de rosetón fue RSV-F-delp23-furdel-trun, escindido.

Tabla 4A: Título viral pulmonar 5 días después de estimulación con RSV

vacunación	Dosis de proteína (µg)	título[b] viral
Ninguno	-	822760
trímero/alumbre	10	546
	1	636
	0.1	903
rosetón/alumbre	10	305
	1	341
	0.1	548
trímero/MF59	10	360
	1	301
	0.1	456
rosetón/MF59	10	244
	1	257

0.1	716

[a]estimulación intranasal con $1x10^5$ unidades formadoras de placas (pfu) de RSV Long

[b]pfu/gramo de pulmón 5 días después de estimulación

Títulos medios geométricos de 7-8 ratas de algodón individuales/grupo.

Si un animal individual tiene un título de <203 (límite de detección) se asignó un título de 100

Tabla 5: Título en suero de neutralización de RSV

		Título[a] en suero de neutralización de RSV			
		alumbre		MF59	
Suero recolectado	Dosis de proteína (µg)	trímero	rosetón	trímero	rosetón
3wp1	10	628	1050	578	229
	1	208	633	165	205
	0.1	57	200	51	65
2wp2	10	3669	4015	3983	3436
	1	3369	2844	5728	3940
	0.1	744	1902	2414	2093

[a]títulos de neutralización de reducción de sincitios de 60 % título media geométrica para dos mezclas de 3-4 de ratas de algodón por grupo

Ejemplo 7 – Vacuna de ARN de RSV

Síntesis de ARN

El ADN de plásmido que codifica para replicón de

alfavirus (Figura 4, SEQ ID NO: 77) sirvió como una platilla para la síntesis de ARN *in vitro*. Para estos experimentos la glicoproteína de fusión de superficie de longitud completa de RSV (RSV-F) se usó (Figura 4). En la distribución de los replicones a células eucarióticas, el ARN de hebra positiva se tradujo para producir cuatro proteínas no estructurales, que conjuntamente replicaron el ARN genómico y transcribieron abundantes ARNm subgenómicos que codifican para el producto génico heterólogo. Debido a la carencia de expresión de las proteínas estructurales de alfavirus, los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago (T7 o SP6) en la dirección 5’ del ADNc del alfavirus facilita la síntesis del ARN de replicón *in vitro* y la ribozima de virus delta de hepatitis (HDV) inmediatamente la dirección 3’ de la poli(A)-extremidad genera el 3’-extremo correcto a través de su actividad de auto-escisión.

Después de la linealización del ADN de plásmido en la dirección 3’ de la ribozima de HDV con una endonucleasa de restricción adecuada, se sintetizaron transcriptos de corrida *in vitro* usando ARN-polimerasa dependiente de ADN derivado de bacteriófago T7 o SP6. Se realizaron transcripciones durante 2 horas a 37°C en presencia de 7.5 mM (T7 ARN-polimerasa) o 5 mM (SP6 RNA-polimerasa) de cada uno de los trifosfatos de nucleósido (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones

proporcionadas por el fabricante (Ambion, Austin, TX). Después de la transcripción, el ADN de plantilla se digirió con TURBO DNasa (Ambion, Austin, TX). El ARN de replicón se precipitó con LiCl y reconstituyó en agua libre de nucleasa. El ARN sin rematar se remató de forma post-trascripcional la Enzima de Remate de Vaccinia (VCE), usando el Sistema de Remate ScriptCap M^7G (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) como se resume en el manual de usuario. El ARN remotado de forma post-transcripcional A se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua libre de nucleasa. La concentración de las muestras de ARN se determinó al medir la densidad óptica a 260 nm. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante.

Formulación de RV01(01) de nanopartículas de lípidos (Liposomas)

Se sintetizó 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-amino (DlinDMA) usando un procedimiento previamente publicado [Hayes, J., Palmer, L., Bremner, K., MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. Journal of Controlled Release, 107: 276-287 (2005)]. 1,2-Diastearoyl-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC) se compró de Genzyme. Se obtuvo colesterol de Sigma-Aldrich (St. Lois, MO). Se obtuvo 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poli-

etilenglicol)-2000] (sal de amonio) (PEG DMG 2000), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poli-etilenglicol)-2000] (sal de amonio) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Soluciones concentradas frescas de lípidos en etanol se prepararon. Se pesaron 37 mg de DlinDMA, 11.8 mg de DSPC, 27.8 mg de colesterol y 8.07 mg de PEG DMG 2000 y se disolvieron en 7.55 ml de etanol. La solución concentrada de lípidos recién preparada se meció suavemente a 37ºC durante 15 minutos para formar una mezcla homogénea. Entonces, se adicionaron 755 µl de la solución concentrada a 1.245 ml de etanol para producir una solución concentrada de lípidos de trabajo de 2 ml. Esta cantidad de lípido se uso para formar LNP con 250 mg de ARN a una relación N:P 8:1 (nitrógeno a fosfato). El nitrógeno protonatable en DlinDMA (el lípido catiónico) y fosfatos en el ARN se usan para este cálculo. Cada µg de molécula de ARN auto-replicante se asumió que contiene 3 nmoles de fosfato aniónico, cada µg de DlinDMA se asumió que contiene 1.6 nmoles de nitrógeno catiónico. También se preparó una solución de trabajo de 2 mL de ARN a partir de una solución de concentrada de ~1µg/µL en amortiguador de citrato 100 mM (pH 6) (Teknova, Hollister, CA)). Tres frascos de vidrio de 20 ml (con barras de agitación) se enjuagaron con solución RNasa (Molecular BioProducts, San Diego, CA) y se lavaron con agua abundante

MilliQ antes del uso para descontaminar los frascos de los ARNsas. Uno de los frascos se usó para la solución de trabajo de ARN y los otros para recolectar la mezcla de lípidos y ARN (como se describe más adelante). Las soluciones de ARN y de lípido de trabajo se calentaron a 37ºC durante 10 minutos antes de que se cargaran en jeringas luer-lok de 3 cc (BD Medical, Franklin Lakes, NJ). Se cargaron 2 ml de amortiguador de citrato (pH 6) en otra jeringa de 3 cc. Las jeringas que contienen ARN y los lípidos se conectaron a un mezclador T (unión PEEK^{MR} 500 µm ID, Idex Health Science, Oak Harbor, WA), usando tubería FEP ([etileno-propileno fluorado] 2 mm ID x 3 mm OD, Idex Health Science, Oak Harbor, WA). La salida del mezclador en T también fue tubería FEP (2 mm ID x 3 mm). La tercera jeringa que contiene el amortiguador de citrato se conectó a una pieza separada de tubería (2 mm ID x 3 mm OD). Todas las jeringas entonces se accionaron a una velocidad de flujo de 7 ml/min usando una bomba de jeringa (kdScientific, modelo no. KDS-220, Holliston, MA). Las salidas de la tubería se colocaron para recolectar las mezclas en un frasco de vidrio de 20 ml (en tanto que se agita). La barra de agitación se extrajo y se dejo que la solución de etanol/solución acuosa llegue el equilibrio temperatura a ambiente durante 1 hora. Se cargaron 4 ml de la mezcla a una jeringa de 5 cc (BD Medical), que se conectó a una pieza de tubería FEP (2 mm ID x 3 mm OD, Idex Health

Science, Oak Harbor, WA) y en otra jeringa de 5 cc conectada a una longitud igual de tubería FEP, se cargó una cantidad igual de amortiguador de citrato 100 mM (pH 6). Las dos jeringas se activaron a 7 mL/min de velocidad de flujo usando la bomba de jeringa y la mezcla final se recolectó en un frasco de vidrio de 20 ml (en tanto que se agita). Entones, la mezcla de recolectada del segundo paso mezclado (liposomas) se hizo pasar a través de una membrana Mustang Q (un soporte de intercambio aniónico que une y remueve moléculas aniónicas, obtenido de Pall Corporation, AnnArbor, MI, EUA). Antes de pasar los liposomas, se hicieron pasar sucesivamente 4 ml de NaOH 1M, 4 ml de NaCl 1M y 10 ml de amortiguador de citrato 100 mM (pH 6), a través de la membrana Mustang. Los liposomas se calentaron durante 10 minutos a 37ºC antes de que se hicieran pasar a través del filtro mustang. Entonces, los liposomas se concentraron a 2 ml y se dializaron contra 10-15 volúmenes de 1X PBS (de Teknova), usando el sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) antes de recuperar el producto final. El sistema TFF y las membranas de filtración de fibras huecas se compraron de Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA) y se usaron de acuerdo a las guías del fabricante. Se usaron membranas de filtración de fibra hueca de polisulfona (número de parte P/N:X1AB-100-20P), con un corte de tamaño de poro de 100 kDa y un área superficial de 8 cm^2. Para experimentos *in vitro* e *in vivo*,

las formulaciones se diluyeron a la concentración requerida de ARN con PBS 1X (de Teknova).

Método preparar emulsión catiónica 17 (CNE17)

Se obtuvieron escualeno, trioleato de sorbitán (Span 85), y monooleato de polioxi-etilen sorbitán (Tween 80) de Sigma (St. Louis, MO, EUA). Se compró 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) de Lipoid (Ludwigshafen Alemania). Se prepararon nanoemulsiones catiónicas (CNE) de forma similar a MF59 cargada como se describe anteriormente, con modificaciones pequeñas Ott, et al. Journal of Controlled Release, 79(1-3):1-5 (2002)). De forma breve, se combinaron componentes solubles en aceite (es decir, escualeno, span 85, lípidos catiónicos, agentes tensioactivos de lípidos) en un vaso de laboratorio, los componentes de lípidos se disolvieron en cloroformo ($CHCl_3$) o de diclorometano (DCM). La solución de lípidos resultante se adicionó directamente al aceite más span 85. El solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 2 horas en una campana de humos antes de combinar la fase acuosa y de homogeneizar la muestra usando un homogenizador IKA T25 a 24K RPM a fin de proporcionar una alimentación homogénea. Las emulsiones primarias se hicieron pasar de tres a cinco veces a través de un homogeneizador Microfluidezer M110S o M110PS con una espiral de enfriamiento de baño de hielo

a una presión de homogeneización de aproximadamente 15k - 20k PSI (Microfluidics, Newton, MA). Las muestras de lote de 20 ml se removieron de la unidad y se almacenaron a 4ºC. La tabla posterior describe la composición de CNE17.

Tabla 6: Composición de CNE17

CNE	**Lípido catiónico (+)**	**mg/ml +Lípido**	**Agente tensioactivo**	**Escualeno**	**Amortiguador/ agua**
CNE17	**DOTAP** (en DCM)	1.40	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	Amortiguador de citrato 10 mM, pH 6.5

Formación de complejos de ARN

El número de nitrógeno en solución se calculó de la concentración de lípido catiónico, por ejemplo DOTAP, tiene un nitrógeno que se puede protonar por molécula. La concentración de ARN se usó para calcular la cantidad de fosfato en solución usando un estimado de 3 nmoles de fosfato por microgramo de ARN. Al variar la cantidad de ARN: lípidos se puede modificar la relación N/P. Se formó en complejo ARN a CNE17 a una relación de nitrógeno/fosfato (N/P, por sus siglas en inglés) de 10:1. Usando estos valores, el ARN se diluyó a la concentración apropiada en agua libre de RNasa y

se adicionó directamente en un volumen igual de emulsión, en tanto que se somete a vórtice de forma ligera. La solución se dejó asentar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Una vez que volvió complejo, la solución resultante se diluyó a la concentración requerida antes de la administración.

Electroporación

La electroporación fue un método muy efectivo para la distribución de vacunas de ANDp y esta técnica se usó para distribuir ARN auto-replicante. Se anestesiaron ratones bajo isofluorano, ambas patas traseras se rasuraron cercanamente para exponer el área en la extremidad que se va a tratar. Se inyectó una dosis de 30 ul de vacuna al músculo de la pantorrilla de la extremidad trasera usando una jeringa de insulina 1/2cc. El músculo se sometió a electroforesis usando el Sistema de Distribución de ADN Elgen^{MR} (Inovio, San Diego). Los parámetros del instrumento son como sigue: 60 V, 2 pulsos cada 60ms. Se distribuyó de forma similar otra dosis a la segunda extremidad, seguido por electroporación.

Partículas de replicón virales (VRP, por sus siglas en inglés)

Para comparar las vacunas de ARN a los planteamientos tradicionales con vectores de ARN para lograr la expresión *in vivo* de genes indicadores o antígenos, se utilizaron partículas de replicón virales (VRP, por sus

siglas en inglés) producidas en células BHK por los métodos descritos por Perri et al. En este sistema, los replicones de antígeno (o gen indicador) consistieron de replicones quiméricos de alfavirus (VCR, por sus siglas en inglés) derivados del genoma de virus de encefalitis equina venezolana (VEEV, por sus siglas en inglés) manejado para contener las secuencias 3'-terminales (3' UTR) de virus de Sindbis y una señal de envasado de virus Sindbis (PS) (ver figura 2 de Perri et al). Estos replicones se envasaron en VRP al someterlas a electroporación de células de riñón de hámster neonato (BHK), junto con ARN auxiliares defectuosos que codifica para la cápsida del virus Sindbis y genes de glicoproteína (ver figura 2 de Perri et al). Las VRP entonces se recolectaron y se titularon por métodos normales y se inocularon en animales en fluido de cultivo u otros amortiguadores isotónicos. Perri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, Romero RE, Tang Z, Bin Q, Dubensky TW, Jr. et al (2003) An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. J Virol 77: 10394-10403.

Vacuna de subunidad de trímero F de RSV

El trímero F de RSV es una proteína recombinante que comprende el ectodominio de RSV-F con una supresión de la región de péptido de fusión que impide la asociación con

otros trímeros. La construcción resultante forma un trímero homogéneo, como se observa por cromatografía de exclusión de tamaño, y tiene un fenotipo esperado consistente con una conformación de post-fusión de F como se observa por microscopía electrónica. La proteína se expresó en células insectiles y se purificó en virtud de una marca HIS en fusión con el C-términal de la construcción seguido por cromatografía de exclusión de tamaño usando técnicas convencionales. La muestra de proteína resultante exhibe más de 95% de pureza. Para la evaluación *in vivo* de las vacunas de subunidad F, se adsorbieron con 100 µg/ml de proteína de trímero en 2 mg/ml de alumbre usando amortiguador de histidina 10 mM, pH 6.3 y la isotonicidad se ajustó con cloruro de sodio a 150 mM. La proteína de subunidad F se adsorbió en alumbre durante noche con agitación suave a 2-8ºC. El pH y la osmolaridad de la vacuna final se puso como objetivo 6.5-7.5 y 240-360 mOsm/kg. La vacuna se caracterizó por adsorción de proteína por SDS-PAGE (Invitrogen Corporation, EUA) y para contenido de endotoxinas por ensayo LAL (Charles River Laboratories, EUA). La vacuna se mezcló por inversión suave antes de la inmunización.

Estudios de inmunogenicidad murina

Grupos de 10 ratones BALB/c hembras de 8-10 semanas de edad que pesan aproximadamente 20 gramos se inmunizaron en el día 0 y el día 21 con sangrados tomados en los días 14, 35

y 49. Todos los animales se inyectaron en los cuádriceps en las dos patas traseras cada una que obtiene un volumen equivalente (50 µl por sitio) para un total de 100 µl de vacuna para distribuir una dosis de antígeno de 10 µg. Cuando se requirió medición de las respuestas de células T, los bazos se recolectaron en el día 35 o 49.

Vacunación y estimulación de ratas de algodón

Se obtuvieron ratas de algodón hembras (S*igmodon hispidis*) de Harlan Laboratories. Todos los experimentos se aprobaron y se realizaron de acuerdo al Comité de Cuidado y Uso Animal de Novartis. Los grupos de animales se inmunizaron de manera intramuscular (i.m., 100 µl) con las vacunas indicadas en los días 0 y 21. Las muestras de suero se recolectaron 2 semanas después de cada inmunización. Los animales de control no vacunados o inmunizados se estimularon intranasalmente (i.n.), con $1x10^5$ UFP RSV 4 semanas después de la inmunización final. La recolección de sangre y la estimulación con RSV se realizó bajo anestesia con isoflurano al 3% usando un vaporizador de precisión.

Ensayos de función de células Tde ratón

Ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares

Se mezclaron de dos a cinco bazos de ratones BALB/c idénticamente vacunados y para cultivo se prepararon suspensiones celulares individuales. Se establecieron dos cultivos estimulados con antígeno y dos cultivos no

estimulados para cada mezcla de esplenocitos. Los cultivos estimulados con antígeno contuvieron $1x10^{-6}$ esplenocitos, péptido 85-93 de RSV-F ($1x10^{-6}$ M), péptido 249-258 de RSV-F ($1x10^{-6}$ M), péptido 51-66 de de RSV-F ($1x10^{-6}$M), mAb anti-CD28 (1 mcg/mL), y Brefeldina A (1:1000). Los cultivos no estimulados no contienen péptidos de RSV-F, y de otro modo fueron idénticos a los cultivos estimulados. Después del cultivo durante 6 horas a 37°C, los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia. Las células se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD4 y anti-CD8 fluorescentemente marcados. Las células se lavaron nuevamente y luego se fijaron con Cytofix/cytoperm durante 20 minutos. Las células fijadas entonces se lavaron con amortiguador Perm-wash y luego se tiñeron con mAb fluorescentemente marcados específicos para IFN-g, TNF-a, IL-2, y IL-5. Las células teñidas se lavaron y luego se analizaron en el citómetro de flujo LSR II. Se usó el software FlowJo para analizar los datos adquiridos. Los subconjuntos de células T CD4+8- y CD8+4- se analizaron de forma separadas. Para cada subconjunto en una muestra dada, se determinó el % de células positivas a citocina. Se calculó el % de células T específicas de antígeno de RSV-F como la diferencia entre el % de células positivas a citocina en los cultivos estimulados con antígeno y el % de células positivas a citocina en los cultivos no estimulados. Los límites de confianza

de 95% para el % de células específicas de antígeno se determinaron usando métodos normales (Statistical Methods, 7th Edition, G.W. Snedecor y W.G. Cochran).

Ensayo de citocinas segregadas

Los cultivos para el ensayo de citocinas segregadas fueron similares a aquellos para el ensayo de inmunofluorescencia de citocinas intracelulares excepto que se omitió Brefeldina A. Se recolectaron sobrenadantes de cultivo después del cultivo durante la noche a 37°C, y se analizaron para múltiples citocinas usado equipos de citocinas Th1/Th2 de ratón de Meso Scale Discovery. La cantidad de cada citocina por cultivo se determinó de curvas normales producidas usando citocinas recombinantes, purificadas suministradas por el fabricante.

ELISA específico de RSV-F

Se valoraron muestras de suero individuales para la presencia de IgG específica de RSV por ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas (ELISA). Se revistieron placas de ELISA (MaxiSorp 96 concavidades, Nunc) durante a 4°C con 1 µg/ml de RSV-F purificado (delp23-furdel-trunc-no escindido) en PBS. Después del lavado (PBS con Tween-20 al 0.1%), las placas se bloquearon con Amortiguador de Bloqueo Superblock en PBS (Thermo Scientific) durante al menos 1.5 horas a 37°C. Las placas entonces se lavaron, las diluciones en serie de suero en diluyente de ensayo (PBS con Tween-20 al 0.1% y suero de

cabra al 5%) de ratas de algodón experimentales o de control se adicionaron, y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después del lavado, las placas se incubaron con IgG anti-rata de algodón, de pollo, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Immunology Consultants Laboratory, Inc, diluida 1:5,000 en diluyente de ensayo) durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las placas se lavaron y a cada concavidad se adicionaron 100 µl de solución de substrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Las reacciones se detuvieron por la adición de 100 µl de H_3PO_4 1M, y se leyó la absorbancia 450 nm usando un lector de placa. Para muestra de suero, se generó una gráfica de densidad óptica (OD) versus logaritmo de la dilución en suero recíproca por regresión no lineal (GraphPad Prism). Los títulos se definieron como la dilución en suero recíproca a una OD de aproximadamente 0.5 (normalizado a sueros mezclados normales de ratas de algodón infectas con RSV con un título definido de 1:2500, que se incluyó en cada placa).

Ensayo de micro-neutralización

Se probaron muestras de suero para la presencia de anticuerpos neutralizantes por una prueba de neutralización de reducción en placa (PRNT). Se adicionaron diluciones en serie de dos veces de suero HI (en PBS con 5% de HI-FBS) a un volumen igual de RSV Long previamente titulado para dar aproximadamente 115 PFU/25 µl. Se incubaron mezclas de

suero/virus durante 2 horas a 37°C y 5% de CO_2, para permitir que se presente la neutralización del virus, y luego se inocularon 25 µl de esta mezcla (que contiene aproximadamente 115 PFU) en concavidades duplicadas de células HEp-2 en placas de 96 concavidades. Después de 2 horas a 37°C y 5% de CO_2, las células se revistieron con 0.75% de Metil-Celulosa/EMEM 5% HI-FBS y se incubaron durante 42 horas. El número de partículas de virus infecciosas se determinó por la detección de formación de sincitios por inmunotinción seguido por conteo automatizado el título de neutralización se define como lo recíproco de la dilución de suero que produce al menos una reducción de 60% en el numero de sincitios por concavidad, con relación a los controles (sin suero).

Carga viral

La carga viral en el pulmón se determinó por ensayo de placa. Específicamente, se recolectaron pulmones y 5 días después de la infección con RSV y se colocó un lóbulo derecho en Medio Eagle Modificado de Dulbecco 2.5 mL (DMEM, Invitrogen) con 25% de sacarosa y se interrumpió con un homogeneizador de tejido. Los sobrenadantes libres de célula de estas muestras se almacenaron a -80°C. Para valorar el virus infeccioso, se inocularon diluciones de homogenado pulmonar clarificado (en PBS con suero bovino fetal inactivado con calor al 5%, HI-FBS) en monocapas de células HEp-2 confluentes en un volumen de 200 µl/concavidad de una

placa de 12 concavidades. Después de 2 horas con balanceo suave periódico (37°C, 5% CO_2), se removió el inoculo, y las células se revistieron con 1.5 ml de agarosa SeaPlaque al 1.25% (Lonza) en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM, Lonza) complementado con 5% HI-FBS, glutamina, y antibióticos. Después de 3-4 días de incubación las células se revistieron nuevamente con 1 ml de agarosa al 1.25% en EMEM (Sigma) que contiene o-1 por ciento de rojo neutral (Sigma). Las placas se contaron un día después con la ayuda de una caja de luz.

Patología de pulmón de rata de algodón

Cinco días después de la estimulación con RSV se recolectaron pulmones y 4 lóbulos de cada animal se recolectaron y fijaron con formalina amortiguada neutral al 10% (NBF) por instilación intra traqueal suave, seguido por fijación de inmersión. Los tejidos se procesaron rutinariamente para preparar secciones teñidas con eosina y hematoxilina para examen microscópico. Se evaluaron los hallazgos usando una modificación de laos criterios previamente publicados [Prince GA, et al., 2001] para los siguientes parámetros: peribronquiolitis, alveolitis, bronquitis, infiltrados celulares perivasculares, y pneumonitis intersticial. Las lesiones se graduaron en una escala semicuantitativa de 4 puntos. El cambo mínimo (+), contuvo uno o pocos focos pequeños; el cambio leve (++) se compuso de focos de tamaño o medio a pequeños el cambio moderado (+) contuvo focos de tamaño frecuente y/o moderado; y cambio marcado (+++) mostró focos

extensivos a confluentes que afectan la mayoría/todo el tejido.

Ejemplo 7 A.- Estudio de estímulo con RSVde ratas de algodón (CRIS14)

El replicón A317, que expresa la glicoproteína de fusión de superficie de RSV (RSV-F) se usó para este experimento. Ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, se les dio vacunaciones intramusculares bilaterales (50 µL por pata) en los días 0 y 21 con ARN-auto-replicante desnudo (A317, 1 µg o 10 µg), ARN auto-replicante formulado en LNP [RV01(01), A317, 0.1 µg o 1 µg), VRP ($5x10^6$ IU)] que expresa RSV-F, subunidad de F-trímero/alumbre (10 µg), o vacuna de RSV inactivada con formalina (5200 FI-pfu). Se recolectó suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Todos los animales se estimularon con $1x10^5$ pfu RSV intranasalmente en el día 49 y se recolectaron pulmones en el día 54 (5dpc) para la determinación de carga viral y patología de pulmón.

Resultados

Tabla 7: Títulos en suero de IgG específica de F en el día 14 y 3+5

		IgG específica de F	IgG específica de F
vacuna	dosis	2wp1	2wp2
A317	10 µg	198	1599
A317	1 µg	78	526

CNE17	1 µg	408	4918
CNE17	0.1 µg	325	2512
RV01(01)	1 µg	531	4351
RV01(01)	0.1 µg	134	1033
VRP	5x106 IU	961	5864
F-trímero/alumbre	10 µg	3526	111893
FI-RSV	5200 FI-pfu	17	2074
ninguna		5	5

Tabla 7. Títulos en suero de IgG específica de F de ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 ratas por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recolectó suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2wp1) 35 (2wp2), todos los animales se estimularon con $1x10^5$ pfu RSV intranasalmente en el día 49. Los pulmones se recolectaron en el día 54 (5dpc) para determinación de carga viral y patología de laboratorio. Los datos se representan como títulos medios geométricos de 8 ratas de algodón individuales por grupo. Si un animal individual tienen un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 8: Títulos en suero de neutralización de RSV en los días 14 y 35

vacuna	dosis	PRNT60 2wp1	PRNT60 2wp2

		2wp1	2wp2
A317	10 µg	78	240
A317	1 µg	58	70
CNE17	1 µg	91	269
CNE17	0.1 µg	63	145
RV01(01)	1 µg	103	667
RV01(01)	0.1 µg	46	130
VRP	$5x10^6$ IU	149	683
F-trímero/alumbre	10 µg	142	>5120
FI-RSV	5200 FI-pfu	28	38
ninguna		30	<20

Tabla 8. Títulos en suero de neutralización de RSV de ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en día 0 y 21. Se recolectó suero para análisis en los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se presentan como títulos de neutralización de reducción de placa de 60 %. Título medio geométrico de 2 mezclas de 4 ratas de algodón por grupo. Si un animal individual tiene un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 9: Título virales pulmonares 5 días después de estimulación con RSV

Vacuna	dosis	pfu/g pulmón
		5dpc
A317	10 µg	397
A317	1 µg	659

CNE17	1 µg	414
CNE17	0.1 µg	572
RV01(01)	1 µg	445
RV01(01)	0.1 µg	716
VRP	$5x10^6$ IU	359
F-trímero/alumbre	10 µg	190
FI-RSV	5200 FI-pfu	5248
ninguno (estimulado)		728618

Tabla 9: Títulos virales pulmonares 5 días después de estimulación con RSV de ratas de algodón (*Sigmodon hispidus*), 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Todos los animales se estimularon con $1x10^5$ pfu de RSV intranasalmente en el día 49. Los pulmones se recolectaron en el día 54 (5dpc) para determinación de carga viral y patología pulmonar. Los datos se presentan como unidades formadoras de placa por gramo de pulmón como se determina por ensayo de placa. Títulos medios geométricos de 8 ratas de algodón individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <200 (límite de detección) se asignó un título de 100.

Tabla 10: Puntuaciones de alveolitis de pulmón 5 días después de estimulación con RSV

		No. de ratas de algodón con

vacuna	Dosis	puntuación de alveolitis indicada				
		0	1	2	3	4
A317l	10 µg	8				
A317l	1 µg	8				
CNE17	1 µg	8				
CNE17	0.1 µg	7	1			
RV01(01)	1 µg	6	2			
RV01(01)	0.1 µg	8				
VRP	$5x10^6$ IU	3	4	1		
F-trímero/alumbre	10 µg	7	1			
FI-RSV	5200 FI-pfu	1	4	3		
ninguno (estimulado)		5	3			

Tabla 10. Alveolitis de pulmón 5 días después de estimulación con RSV de ratas de algodón (*Sigmodon hispidus)*, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Todos los animales se estimularon con $1x10^5$ pfu de RSV

intranasalmente en el día 49. Los pulmones se recolectaron en el día 54 (5dpc) para la determinación de carga viral y patología pulmonar. Las lesiones se graduaron en una escala semicuantitativa de 4 puntos. El cambio mínimo (1) contuvo uno o menos puntos pequeños; el cambio moderado (2) se compuso de puntos de tamaño pequeño a medio; el cambio moderado (3) contuvo puntos de tamaño frecuente y/o moderado; el cambio marcado (4) mostró puntos extensivos a confluentes que afectan la mayoría/todo el tejido.

Conclusiones

Un objetivo de este estudio fue determinar la inmunogenicidad y capacidad protectora de ARN de replicón en el modelo de RSV en rata de algodón. Otro objetivo fue evaluar el efecto de liposomas y formulaciones de CNE17 en la inmunogenicidad y eficiencia de vacunas. El ARN de replicón no formulado indujo anticuerpos neutralizantes de RSV e IgG específica de F en suero después de una vacunación, y esta respuesta se reforzó por una segunda vacunación. Los liposomas y formulaciones de CNE17 fueron similarmente efectivos en este modelo, reforzando los títulos de IgG específica de F a 1 μg de ARN de replicón aproximadamente 8 veces y títulos de neutralización por 4-10 veces (CNE17 y Liposomas,

respectivamente) después de la segunda vacunación. Todas las vacunas de ARN de replicón proporcionaron protección de un estímulo nasal de RSV, reduciendo la carga viral pulmonar mayor de tres órdenes de magnitud cuando se mide 5 días después. La magnitud y capacidad protectora de la respuesta inmunitaria generada por 1 μg de ARN de replicón formulado con liposomas estuvo dentro de dos veces la respuesta producida por $5x10^6$ VRP. La subunidad de trímero con adyuvante de alumbre produjo los títulos totales más altos de ELISA de IgG anti-F, produjo los títulos más altos de neutralización, y produjo el grado más grande de protección de títulos de RSV en el pulmón en la estimulación de cualquiera de las preparaciones de vacuna probadas en este estudio.

Ejemplo 7B.- Estudio de Inmunogenicidad de RSV-F (10-1001)

El replicón A317 que expresa la glicoproteína de fusión superficial de RSV (RSV-F) se usó para este experimento. Ratones BALB/c, 10 animales por grupo, se les dio vacunaciones intramusculares bilaterales (50 μL por pata) en los días 0 y 21 con RSV-F que expresa VRP ($1x10^6$ IU), ARN auto-replicante desnudo (A317, 1 μg), ARN auto-replicante distribuido usando electroporación (A317, 10 μg), ARN auto-replicante formulado en

liposomas (RV01(01), A317, 0.1 µg o 1 µg) y ARN auto-replicante formulado con CNE17 (A317, 0.1 µg o 1 µg). Se recolectó suero para análisis de anticuerpo en los días 14 (2wp1), 35 (2wp2) y 49 (4wp2). Se recolectaron los bazos de 5 ratones por grupo en el día 49 (4wp2) para análisis de células T.

Resultados

Tabla 11: Títulos en suero de IgG específica de F en el día 14

	1 µg A317	0.1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0.1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 IU VRP
	529	14385	19299	2429	3373	5	6041
	1530	10713	19170	2060	4417	88	4912
	2734	12756	13860	2012	1927	964	12923
	2503	11546	17352	1887	3597	7235	7075
	5539	15300	22094	3174	5731	2558	6829
	1033	14072	21213	3904	2852	5105	4885
	5110	18274	17915	1481	3739	9806	3680
	1106	7873	15659	2345	4904	2787	9813
	1493	17175	6669	3084	3824	2576	8631
	3456	19730	13259	2497	3004	1858	6314
GMT	**1980**	**13731**	**15903**	**2398**	**3590**	**1180**	**6685**

Tabla 11. (10-1001) Títulos en suero de IgG específica de F de ratones, 10 animales por grupo, 14 días después de vacunación intramuscular. Los datos se representan como títulos para ratones individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 12: Título en suero de IgG especifica de F en el día 35

	1 µg A317	0.1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0.1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 IU VRP
	958	128208	227021	48079	8473	14612	813045
	12518	191729	212911	17589	58556	22805	365485
	4839	315786	303987	8522	12053	32156	961601
	10128	218147	335071	10985	20395	24090	349215
	18451	225622	155893	30801	51514	31053	297526
	9805	182693	519162	13372	26348	18105	207652
	19154	185342	169332	5137	80686	23918	1580066
	4490	82744	489441	47173	21014	9091	900889
	14674	190010	131361	78232	61076	21006	822285
	15223	553164	254500	24135	25499	9835	587121
GMT	**8532**	**201892**	**253687**	**20767**	**29111**	**19117**	**579033**

Tabla 12. (10-1001) Títulos en suero de IgG específica de F de ratones, 10 animales por grupo, días después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recolectó suero para análisis de anticuerpo en el día 35 (2wp2). Los datos se representan como títulos para ratones individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 13: Títulos en suero de IgG específica de F en el día 49

1 µg A317	0.1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0.1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 IU VRP
1248	140407	133787	52747	34245	30388	366771
12441	155669	182995	29352	128030	20768	209400
4967	203059	211020	10857	17016	53763	360615
14536	134253	488698	28800	57250	28373	191475
31556	370726	158816	444613	76576	34318	139148
13815	184738	185184	20314	42357	35736	63839
20495	141644	103026	4546	101445	34611	192101
4800	76711	312096	27476	47285	10138	177858
19159	143275	139811	68386	55865	23958	130218
26836	479594	230331	24360	52871	13624	174378

	1 µg A317	0.1 µg RV01(01)	1 µg RV01(01)	0.1 µg CNE17	1 µg CNE17	10 µg A317 + EP	1E6 IU VRP
GMT	**10947**	**177168**	**194350**	**24891**	**53615**	**25888**	**180420**

Tabla 13. (10-1001). Títulos en suero de IgG específica de F de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recolectó suero para análisis de anticuerpo en el día 49 (4wp2). Los datos se representan como títulos para ratones individuales y los títulos medios geométricos de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 14: Títulos de neutralización en suero de RSV en el día 35

A317, 1µg	RV01(01) 0.1µg	RV01(01) 1µg	CNE17 0.1µg	CNE17 1µg	VRP 1E6 IU
2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2
NA	143	106	NA	NA	265
NA	272	62	NA	NA	73
NA	294	<40	NA	NA	77
NA	814	334	NA	NA	140
NA	67	86	NA	NA	290

	A317, 1µg	RV01(01) 0.1µg	RV01(01) 1µg	CNE17 0.1µg	CNE17 1µg	VRP 1E6 IU
	NA	420	125	NA	NA	134
	NA	<40	566	NA	NA	466
	NA	104	292	NA	NA	127
	NA	241	<40	NA	NA	75
	NA	223	44	NA	NA	77
GMT	**NA**	**176**	**96**	**NA**	**NA**	**139**

Tabla 14. (10-1001) Títulos en suero de neutralización se RSV de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recolectó suero para análisis en el día 35 (2wp2). Los datos se representan como títulos de neutralización de reducción de placa de 60 % de ratones individuales y el título medio geométrico de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <40 (límite de detección) se asignó un título de 20.

NA= no valorado

Tabla 15: Títulos en suero de neutralización de RSV en el día 49

	A317, 1µg	RV01(01) 0.1µg	RV01(01) 1µg	CNE17 0.1µg	CNE17 1µg	VRP 1E6 IU
	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2
	<40	194	82	<40	<40	161
	<40	272	165	<40	70	64
	<40	142	<40	<40	<40	126
	<40	881	442	<40	76	151
	<40	61	108	42	57	194
	<40	426	156	52	<40	123
	<40	78	814	<40	<40	1033
	<40	<40	291	173	<40	174
	<40	246	103	<40	<40	122
	<40	574	396	<40	<40	76
GMT	**<40**	**231**	**215**	**29**	**29**	**155**

Tabla 15. (10-1001) Títulos de neutralización en suero de RSV de ratones, 10 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en los días 0 y 21. Se recolectó suero para análisis en el día 49 (4wp2). Los datos se representan como títulos de neutralización de reducción de placa de 60 % de ratones individuales y el título media geométrica de 10 ratones individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <40 (límite de detección) se asignó un título de

20.

NA= no valorado

Tabla 16: Respuesta de células T en el día 49

Respuesta de células T CD4 esplénicas 4wp2	células T esplénicas CD4+CD8-: % positiva a citocina y específico para péptido F51-66 de RSV			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 IU	**0.07**±0.06	0.04±0.05	0.00±0.02	**0.10**±0.04
1 µg A317	0.00±0.05	**0.05**±0.04	0.00±0.01	**0.03**±0.02
RV01(01) 1 µg	0.04±0.06	**0.07**±0.05	0.00±0.01	**0.09**±0.03
RV01(01) 0.1 µg	**0.06**±0.05	**0.08**±0.04	0.00±0.01	**0.10**±0.03
CNE17 1 µg	0.00±0.05	0.04±0.04	0.00±0.01	**0.05**±0.02
CNE17 0.1 µg	0.00±0.05	0.02±0.04	0.00±0.01	**0.02**±0.02
10 µg vA317 + EP	0.02±0.06	**0.04**±0.04	0.01±0.01	**0.05**±0.03
ninguna	0.04±0.06	0.00±0.05	0.00±0.02	0.00±0.01

Tabla 16. (10-1001) Frecuencias de células T esplénicas CD4+ específicas de F de RSV en el día 49 (4wp2). Se muestran frecuencia positiva a citocinas neta (específica de antígeno) (%) ± 95 % medio intervalo de confianza. Las frecuencias netas mostradas en negritas indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas >0.

Tabla 17: Respuesta de células T en día 49

Respuesta de células T CD8 esplénicas 4wp2	células T esplénicas CD8+CD4-: % positivo a citocina y específico para péptidos F85-93 y F249-258 de RSV-F			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 IU	**3.48**±0.29	1.21±0.18	-0.03±0.05	**3.31**±0.28
1 µg A317	0.74±0.15	**0.46**±0.11	-0.03±0.04	**0.70**±0.14
RV01(01) 1 µg	3.69±0.28	**1.43**±0.18	-0.01±0.04	**3.44**±0.27
RV01(01) 0.1 µg	**2.52**±0.23	**1.10**±0.15	0.03±0.03	**2.31**±0.22
CNE17 1 µg	1.25±0.17	0.60±0.12	0.01±0.03	**1.15**±0.16
CNE17 0.1 µg	0.89±0.15	0.49±0.11	-0.03±0.04	**0.83**±0.14
10 µg vA317 + EP	0.85±0.16	**0.53**±0.11	0.01±0.04	**0.72**±0.15
ninguna	0.01±0.07	0.00±0.05	-0.02±0.05	0.02±0.06

Tabla 17. (10-1001) Frecuencias de células T esplénicas CD8+ específicas de RSV-F en el día 49 (4wp2). Se muestran frecuencia positiva a citocinas neta (específica de antígeno) (%) ± 95 % medio intervalo de confianza. Las frecuencias netas mostradas en negritas indican respuestas estimuladas que fueron estadísticamente significativas >0.

Conclusiones

La formulación de liposoma mejoró significativamente la inmunogenicidad, como se determina por títulos incrementados de IgG específica de F (incremento de 8-30 veces), títulos de neutralización, y respuestas de células T CD4 y CD8, con relación al control de ARN desnudo. En forma sorprendente, los títulos de IgG específica de F y

los títulos de neutralización para RV01(01) tanto a la dosis de 0.1 como de 1.0 μg fueron equivalentes a la VRP ($1x10^6$ IU). La respuesta de células T para la formulación de LNP fueron equivalentes a la mayor dosis al VRP ($1x10^6$ IU). La formulación del ARN auto-replicante con CNE17 mejoró significativamente la inmunogenicidad, como se determina por títulos incrementados de IgG específica de F (incremento de 2-5 veces), títulos de neutralización, y respuestas de células T CD4 y CD8, con relación al control de ARN desnudo. La electroporación de ARN mejoró la inmunogenicidad con relación al control de ARN desnudo, pero fue significativamente menor que la distribución de liposoma.

Ejemplo 7C.- Estudio de inmunogenicidad de RSV-F (10-1018)

El replicón A317 que expresa la glicoproteína de fusión superficial de RSV (RSV-F) se usó para este experimento. Ratones BALB/c, 8 animales por grupo, se les dio vacunaciones intramusculares bilaterales (50 μL por pata) en los días 0 y 21 con RSV-F que expresa VRP ($1x10^6$ IU), ARN auto-replicante desnudo (A306, 1, 0.1, 0.01 μg), y ARN auto-replicante formulado en liposomas (RV01(01), usando el método 1 (A317, 10.0, 1.0, 0.1, 0.01 μg). Se recolectó suero para análisis de anticuerpo en los días 14 (2wp1), y (2wp2). Se recolectaron los bazos de 5 ratones por grupo en el día 49 (4wp2) para análisis de células T.

Resultados

La formulación de liposoma de RV01(01) tiene un diámetro promedio de partícula Z de 158 nm con un índice de polidispersidad de 0.14, la eficiencia de encapsulación fue 96 %. Los títulos en suero de IgG específica de F en los días 14 y 35 se muestran en las tablas 18 y 19 y las respuestas de células T en el día 49 se muestran en las tablas 20 y 21.

Tabla 18: Títulos en suero de IgG específica de F en el día 14 y 35

	VRP		**A317**					
	1E6 IU		**1 µg**		**0.1 µg**		**0.01 µg**	
	2wp1	**2wp2**	**2wp1**	**2wp2**	**2wp1**	**2wp2**	**2wp1**	**2wp2**
	6334	39539	772	4687	5	2334	143	1377
	1500	14895	5	142	5	161	5	333
	5450	38252	109	2972	5	145	5	5
	1835	12831	5	3674	5	97	5	5
	2277	30326	5	5003	5	1077	5	175
	2818	33437	663	8258	221	457	5	5
	2405	22551	257	845	5	1558	5	456
	2137	19179	5	1765	5	5	5	180
GMT	**2735**	**24427**	**41**	**2144**	**8**	**259**	**8**	**73**

Tabla 18: (10-1018) Títulos en suero de IgG específica de F en ratones, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en día 0 y 21. Se recolectó suero para análisis de anticuerpos en los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2).

Los datos se presentan como ratones individuales y los títulos medios geométricos de 8 ratas de algodón individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 19: Títulos en suero de IgG específica de F en el día 14 y 35

	RV01(01)							
	10 µg		**1 µg**		**0.1 µg**		**0.01 µg**	
	2wp1	**2wp2**	**2wp1**	**2wp2**	**2wp1**	**2wp2**	**2wp1**	**2wp2**
	5880	82689	7255	45018	4072	22174	619	2872
	6126	42529	3009	22288	3974	27730	474	3603
	8069	76263	5385	23561	3272	15328	914	2692
	5966	108234	4148	53675	3968	24456	2011	11542
	8590	57912	4210	37004	4950	13014	903	4684
	7172	74162	2179	24179	2856	13694	1575	6720
	8072	122796	1640	5994	4073	17849	438	16514
	8706	83601	5725	28760	3797	17342	1058	13665
GMT	**7235**	**77338**	**3783**	**25790**	**3826**	**18325**	**879**	**6235**

Tabla 19: Continúa de 23A. (10-1018) Títulos en suero de IgG específica de F en ratones, 8 animales por grupo, después de vacunaciones intramusculares en día 0 y 21. Se recolectó suero para análisis de anticuerpo en los días 14 (2wp1) y 35 (2wp2). Los datos se presentan como

animales individuales y los títulos medios geométricos (GMT) de 8 ratas de algodón individuales por grupo. Si un animal individual tiene un título de <25 (límite de detección) se asignó un título de 5.

Tabla 20: Respuestas de células T en día 49

Respuestas de células T esplénicas 4wp2	células T esplénicas CD4+CD8-: % positivo a citocina y específico para péptido F51-66 de RSV-F			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 IU	**0.00**±0.02	0.07±0.02	0.00±0.01	**0.07**±0.03
1 µg A317	0.01±0.01	**0.03**±0.02	0.00±0.01	**0.03**±0.02
0.1 µg A317	0.00±0.01	0.01±0.01	0.700±0.00	0.01±0.01
RV01(01) 10 µg	0.00±0.00	**0.01**±0.01	0.01±0.01	**0.00**±0.01
RV01(01) 1 µg	**0.02**±0.01	**0.05**±0.02	0.00±0.00	**0.06**±0.02
RV01(01) 1 µg	0.03±0.02	0.08±0.02	0.00±0.01	**0.09**±0.02
RV01(01) 0.1 µg	0.02±0.01	0.03±0.01	0.00±0.01	**0.03**±0.02
RV01(01) 0.01 µg	0.00±0.00	**0.02**±0.02	0.01±0.01	**0.02**±0.02
ninguna	0.00±0.00	0.00±0.01	0.00±0.01	0.01±0.01

Tabla 20. Frecuencias de células T esplénicas CD4+ específicas de RSV-F en día 49 (Expt. 10-1018, 4wp2). Se muestran la frecuencia positiva a citocinas neta (específica de antígeno) (%)±95 % medio intervalo de confianza. Las frecuencias netas mostradas en negritas indican respuestas

estimuladas que fueron estadísticamente significativas >0.

Tabla 21: Respuesta de células T en día 49

Respuesta de células T esplénicas 4wp2	células T esplénicas CD8+CD4-: % positivo a citocinas y específico para péptidos F85-93 y F249-258 de RSV-F			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 IU	**2.54**±0.21	0.58±0.10	0.00±0.01	**2.64**±0.21
1 µg A317	1.68±0.17	**0.45**±0.09	0.00±0.02	**1.75**±0.18
0.1 µg A317	0.21±0.07	**0.08**±0.04	0.01±0.02	**0.30**±0.08
0.01 µg A317	0.06±0.05	**0.05**±0.03	0.01±0.02	**0.16**±0.06
RV01(01) 10 µg	**3.32**±0.23	**0.69**±0.11	0.00±0.02	**3.90**±0.25
RV01(01) 1 µg	1.81±0.17	0.59±0.10	0.00±0.02	**2.04**±0.20
RV01(01) 0.01 µg	0.91±0.15	0.32±0.07	0.00±0.01	**1.06**±0.14
RV01(01) 0.01 µg	0.58±0.10	**0.33**±0.08	0.00±0.01	**0.64**±0.11
ninguna	0.01±0.02	0.01±0.01	0.00±0.01	0.00±0.05

Tabla 21. Frecuencias de células T CD8+ escplénicas específicas de F en día 49 (Expt. 10-1018, 4wp2). Se muestran la frecuencia positiva a citocinas neta (específica de antígeno) (%)±95 % medio intervalo de confianza. Las frecuencias netas mostradas en negritas indican respuestas

estimuladas que fueron estadísticamente significativas >0.

Conclusiones

La formulación de liposoma mejoró significativamente la inmunogenicidad, como se determina por títulos incrementados de IgG específica de F y frecuencias de células T, con relación a los controles de ARN desnudo. Los títulos de IgG específica de F y las frecuencias de células T CD8 para RV01(01) al a dosis de 10 μg de ARN se mejoró con relación al grupo de VRP ($1x10^6$ IU).

Referencia adicionales

Las siguientes referencias se incorpora de este modo como referencia para todos los propósitos.

1. *Fields Virology*. 4th edition, 2001.

2. Snell *et al.* (1997) *Virus Genes* 14:63-72.

3. Bembridge *et al.* (1999) *J Virol* 73: 10086-10094.

4. Li *et al.* (1998) *J Exp Med* 188:681-688

5. Patente de los Estados Unidos No. 6,060,308.

6. Yin *et al.* (2006) *Nature* 439:38-45.

7. Kim *et al.* (2007) *J Med Virol* 79: 820-828.

8. Yin *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(26):9288-93.

9. Chen *et al.* (2004) *J Virol* 78:4508-16.

10. Yang et at. (2002) *J Virol* 76:4634-42.

11. Harbury *et al.* (1993) *Science* 262:1401-1407.

12. Stevens *et al.* (2004) *Science* 303:1866-70.

13. Burkhard *et al.* (2001) *Trends Cell Biol* 11:82-88.

14. Section 5.5.2 of Proteins by Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).

15. Yu (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:1113-1129.

16. Muller *et al.* (2000) *Methods Enzymol* 328:261-282.

17. Beck & Brodsky (1998) *J Struct Biol* 122:17-29.

18. Lupas (1996) *Trends Biochem Sci* 21:375-382.

19. Adamson *et al.* (1993) *Curr Opin Biotechnol* 4:428-347.

20. Kammerer (1997) *Matrix Biol* 15:555-568.

21. Chao *et al.* (1998) *J Chromatog B Biomed Sci Appl* 715:307-329.

22. Arndt *et al.* (2002) *Structure* 10:1235-1248.

23. Liu & Lu (2002) *J Biol Chem* 277:48708-48713.

24. WO2006/011060.

25. Section 5.5.3 of Proteins by Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).

26. Zhang & Chen (1999) *J Biol Chem* 274:22409-22413.

27. Slovic *et al.* (2003) *Protein Sci* 12:337-348

28. Gardner & Dutch (2007) *J Virol* 8 1:8303-14.

29 Gennaro (2000) *Remington: The Science and*

Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.

30. Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.

31. Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2566-77.

32. Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.

33. Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.

34. Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425-9.

35. Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.

36. Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.

37. Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

38. Patente de los Estados Unidos No. .6355271.

39. WO00/23105.

40. Patente de los Estados Unidos No. . 5,057,540.

41. WO96/33739.

42. EP-A-0109942.

43. WO96/11711.

44. WO00/07621.

45. Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.

46. Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.

47. Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.

48. WO95/17211.

49. WO98/42375.

50. Singh *et al* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.

51. WO99/27960.

52. Patente de los Estados Unidos No. . 6,090,406.

53. Patente de los Estados Unidos No. . 5,916,588.

54. EP-A-0626169.

55. WO99/52549.

56. WO01/21207.

57. WO01/21152.

58. Dyakonova *et al*. (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.

59. FR-2859633.

60. Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.

61. WO2004/064715.

62. De Libero *et al*, (2005) *Nature Reviews Immunology* 5:485-496

63. Patente de los Estados Unidos No. .5,936,076.

64. Old *et al.*, *J Clin Investig*, 113:1631-1640

65. US2005/0192248

66. Yang *et al*. (2004) *Angew Chem Int Ed* 43:3818-3822

67. WO2005/102049.

68. Goffet *et al* (2004) *Am Chem Soc* 126:13602-13603

69. WO03/105769.

70. Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.

71. WO90/14837.

72. Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.

73 .Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.

74. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

75. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

76. Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.

77 .Hariharan *et al*. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.

78. WO95/l 1700.

79. Patente de los Estados Unidos No. .6,080,725.

80. WO2005/0971 81.

81. Tassignon *et al*. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.

82. Myers *et al*. (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.

83. Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 0.

84. Johnson *et al*. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.

85. Baldrick *et al*. (2002) *Regulatory Toxicol*

Pharmacol 35:398-413.

86. Patente de los Estados Unidos No. . 4,680,338.

87. Patente de los Estados Unidos No. . 4,988,815.

88. WO92/15582.

89. Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:57 1-577.

90. Wu *et al*. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.

91. Vasilakos *et al*. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.

92. Patentes de los Estados Unidos No.s. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000, and 6924293.

93. Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

94. WO2004/060308.

95. WO2004/064759.

96. Patente de los Estados Unidos No. . 6,924,271.

97. US2005/0070556.

98. Patente de los Estados Unidos No. . 5,658,731.

99. Patente de los Estados Unidos No. . 5,011,828.

100. WO2004/87 153.

101. Patente de los Estados Unidos No.. 6,605,617.

102. WO02/18383.

103. WO2004/018455.

104. WO03/082272.

105. WO2006/002422.

106. Johnson *et al*. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

107. Evans *et al*. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.

108. Andrianov *et al*. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.

109. Payne *et al*. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.

110. Thompson *et al*. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.

111. Kandimalla *et al*. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.

112. WO02/26757.

113. WO99/62923.

114. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

115. McCluskie *et al*. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.

116. WO98/40100.

117. Patente de los Estados Unidos No. 6,207,646.

118. Patente de los Estados Unidos No. 6,239,116.

119. Patente de los Estados Unidos No. 6,429,199.

120. Kandimalla *et al*. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3): 654-658.

121. Blackwell *et al*. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.

122. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.

123. WO01/95935.

124. Kandimalla *et al*. (2003) *BBRC* 306:948-953.

125. Bhagat *et al*. (2003) *BBRC* 300:853-861.

126. WO03/035836.

127. WO01/22972.

128. Thompson *et al*. (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.

129. Solicitud de patente de RU GB-A-22202 11.

130. WO94/21292.

131. WO94/00153.

132. WO95/17210.

133. WO96/26741.

134. WO93/19780.

135. WO03/011223.

136. Meraldi *et al*. (2003) *Vaccine* 21:2485-249 1.

137. Pajak *et al*. (2003) *Vaccine* 21:836-842.

138. Patente de los Estados Unidos No. 6,586,409.

139. Wong *et al*. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.

140. US2005/0215517.

Las enseñanzas completas de todos los documentos citados en la presente se incorporan de este modo en la presente como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica, caracterizada porque comprende una población de polipéptidos F de virus sincitial respiratorio soluble (F de RSV) en donde

a) cada polipéptido comprende un dominio HRA y un dominio HRB.

b) los polipéptidos están en una forma seleccionada del grupo que consiste en monómeros, trímeros y una combinación de monómeros y trímeros; y

c) en donde la composición inmunogénica es al menos 95% libre de lípidos y lipoproteínas en una base en masa.

2. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los trímeros comprenden trímeros monodispersados.

3. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los polipéptidos F de RSV están en la forma de una combinación de monómeros y trímeros.

4. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque los monómeros y trímeros están en equilibrio dinámico.

5. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son polipéptidos de ecto-dominio.

6. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son no-escindidos.

7. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son escindidos.

8. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque además comprende un adyuvante.

9. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque al menos el 80% en masa de los polipéptidos F de virus sincitial respiratorio soluble (F de RSV) están presentes en trímeros.

10. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque al menos el 90% en masa de los polipéptidos F de virus sincitial respiratorio soluble (F de RSV) están presentes en trímeros.

11. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque los trímeros comprenden trímeros monodispersados.

12. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque los trímeros comprenden trímeros monodispersados.

13. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son escindidos.

14. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son escindidos.

15. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son escindidos en un sitio de escisión de furina.

16. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque los polipéptidos solubles F de RSV son escindidos en un sitio de escisión de furina.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden proteína F de RSV, a métodos para preparar composiciones que contienen polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV, y a ciertas proteínas F de RSV, manejadas, y ácidos nucleicos que codifican para las proteínas F de RSV, manejadas. Las composiciones preparadas usando los métodos pueden contener polipéptidos de ecto-dominio de proteína F de RSV en una forma y conformación deseada, individual o predominante. La invención también se refiere a métodos para inducir una respuesta inmunitaria a F de RSV.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 008853

Bogotá D.C., Enero 22 de 2015 - 16:30:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	210405215	22/01/2015	37.103.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0011157

Bogotá D.C., Enero 29 de 2015 - 10:41:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	170	05/01/2015		202.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
6	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	192.000.00
				$192.000.00

SON: **CIENTO NOVENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____