

MUTANTES DE PROTEÍNA F DE RSV

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad para la Solicitud
5 Provisional de los Estados Unidos No. 62/387,270 presentada
el 23 de diciembre de 2015 y la Solicitud Provisional de los
Estados Unidos No. 62/421,184 presentada el 11 de noviembre
de 2016. El contenido total de cada una de las solicitudes
anteriores se incorpora en la presente para referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con vacunas en
general y específicamente, con vacunas contra los virus
sinciciales respiratorios.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus sincicial respiratorio o RSV, es un virus
respiratorio que infecta los pulmones y vías respiratorias.
El RSV es la causa principal de enfermedad viral seria del
20 tracto respiratorio inferior en infantes a nivel mundial y
una causa importante de enfermedades respiratorias en los
adultos mayores. Sin embargo, no se han aprobado vacunas para

prevenir la infección por RSV.

El RSV es un miembro de la familia *Paramyxoviridae*. Su genoma consiste de una molécula de ARN en sentido negativo de una sola hebra que codifica 11 proteínas, incluyendo nueve
5 proteínas estructurales (tres glicoproteínas y seis proteínas internas) y dos proteínas no estructurales. Las proteínas estructurales incluyen tres glicoproteínas de superficie de transmembrana: la proteína G de unión, la proteína F de fusión, y la proteína SH hidrofóbica pequeña. Existen dos
10 subtipos de RSV, A y B. Difieren principalmente en la glicoproteína G, mientras que la secuencia de la glicoproteína F se encuentra más conservada entre los dos subtipos.

La glicoproteína F madura tiene tres dominios
15 generales: ectodominio (ED), dominio de transmembrana (TM), y una cola citoplásmica (CT). La CT contiene un solo residuo de cisteína palmitoilado.

La glicoproteína F de RSV de humano se transduce inicialmente desde el ARNm como un simple precursor de
20 polipéptido de 574 aminoácidos (denominado "F0" o "precursor F0"), el cual contiene una secuencia de péptido de señal (aminoácidos 1-25) en el N-término. Después de la

transducción, el péptido de señal se retira por una peptidasa de señal en el retículo endoplásmico. La porción restante del precursor F0 (es decir, residuos 26-574) puede escindirse aún más en dos sitios polibásicos (a.a. 109/110 y 136/137) por proteasas celulares (en particular, furina), que elimina una secuencia de intervención de 27 aminoácidos designada como pep27 (aminoácidos 110-136) y genera dos fragmentos enlazados designados F1 (porción C-terminal; aminoácidos 137-574) y F2 (porción N-terminal; aminoácidos 26-109). F1 contiene un péptido de fusión hidrofóbica en su N-término y dos regiones de siete repeticiones (HRA y HRB). HRA se encuentra cerca del péptido de fusión, y HRB se encuentra cerca del dominio de TM. Los fragmentos F1 y F2 se enlazan juntos a través de dos enlaces disulfuro. Ya sea la proteína F0 no escindida sin la secuencia de péptido de señal o un heterodímero de F1-F2 puede formar un promotor F de RSV. Tres de tales promotores se ensamblan para formar el complejo de proteína F de RSV final, el cual es un homotrímero de los tres protómeros.

Las proteínas F de los subtipos A y B son alrededor de 90 por ciento idénticas en la secuencia de aminoácidos. Una secuencia de ejemplo del polipéptidos precursor F0 para el subtipo A se proporciona en SEQ ID NO: 1 (cepa A2; GenBank

GI: 138251; Proteína Suiza P03420), y para los subtipos B se proporciona en SEQ ID NO: 2 (cepa 18537; GenBank GI: 138250; Proteína Suiza P13843). Ambas SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2 son secuencias de 574 aminoácidos. La secuencia de péptido de
5 señal para SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2 también se ha reportado como los aminoácidos 1-25 (GenBank y UniProt). En ambas secuencias, el dominio de TM es de aproximadamente los aminoácidos 530 a 550, pero ha sido reportado de forma alternativa como 525-548. La cola citoplásmica comienza en
10 cualquiera del aminoácido 548 ó 550 y termina en el aminoácido 574, con el residuo de cisteína palmitoilado ubicado en el aminoácido 550.

Uno de los antígenos primarios explorados para vacunas con la subunidad de RSV es la proteína F. El trímero
15 de proteína F de RSV media la fusión entre la membrana de virión y la membrana de la célula huésped y también promueve la formación del sincicio. En el virión previo a la fusión con la membrana de la célula huésped, la población más grande de moléculas F forma una estructura conformada en paleta, con
20 el dominio de TM anclado en la envoltura viral [Dormitzer, P.R., Grandi, G., Rappuoli, R., Nature Reviews Microbiol, 10, 807, 2012.]. Esta conformación se denomina como la

conformación previa a la fusión. F de RSV previa a la fusión se reconoce por los anticuerpos monoclonales (mAbs) D25, AM22, y MPE8, sin discriminación entre los estados oligoméricos. Los trímeros F previos a la fusión se reconocen específicamente por el mAb de AM14 [Gilman MS, Moin SM, Mas V et al. Characterization of a prefusión-specific antibody that recognizes a quaternary, cleavage-dependent epitope on the RSV fusión glycoprotein. PLoS Pathogens, 11(7), 2015]. Durante el ingreso de RSV en las células, la proteína F se reorganiza desde el estado previo a la fusión (que puede denominarse en la presente como "F previa"), a través de una estructura extendida intermedia, a un estado posterior a la fusión ("F posterior"). Durante esta reorganización, la espiral enrollada C-terminal de la molécula previa a la fusión se disocia en sus tres hebras constituyentes, las cuales entonces se envuelven alrededor de la cabeza globular y se unen a tres hélices adicionales para formar el paquete de seis hélices después de la fusión. Si un trímero F de RSV previo a la fusión se somete a condiciones químicas o físicas duras de forma incrementada, tales como temperatura elevada, sufre cambios estructurales. Inicialmente, existe una pérdida de la estructura trimérica (al menos localmente dentro de la

molécula), y después la reorganización en la forma posterior a la fusión y luego la desnaturalización de los dominios.

Para evitar el ingreso viral, se supone que los anticuerpos que neutralizan F específica deben unir la conformación previa a la fusión de F en el virión, o de forma potencial el intermediario extendido antes de que se fusione la envoltura viral con una membrana celular. De este modo, la forma previa a la fusión de la proteína F se considera la conformación preferida como el antígeno de vacuna deseado [Ngwuta, J.O., Chen, M., Modjarad, K., Joyce, M.G., Kanekiyo, M., Kumar, A., Yassine, H.M., Moin, S.M., Killikelly, A.M., Chuang, G.Y., Druz, A., Georgiev, I.S., Rundlet, E.J., Sastry, M., Stewart-Jones, G.B., Yang. Y., Zhang, B., Nason, M.C., Capella, C., Peeples, M., Ledgerwood, J. E., McLellan, J.S., Kwong, P.D., Graham, B.S., Science Translat. Med., 14, 7, 309 (2015)]. Después de la extracción de una membrana con tensioactivos tales como Tritón X-100, Tritón X-114, NP-40, Brij-35, Brij-58, Tween 20, Tween 80, Octil-glucósido, Octil-tiogluco-sido, SDS, CHAPS, CHAPSO, o su expresión como un ectodominio, tensión física o química o almacenamiento, la glicoproteína F se convierte fácilmente a la forma después de la fusión [McLellan JS, Chen M, Leung S et al. Structure of

RSV fusion glycoprotein trimer bound to a pre-fusión-specific neutralizing antibody. Science 340, 1113-1117 (2013); Chaiwatpongsakorn, S., Epand, R.F., Collins, P.L., Epand R.M., Peeples, M.E., J Virol. 85(8):3968-77 (2011);Yunus, A.S., Jackson T.P., Crisafi, K., Burimski, I., Kilgore, N.R., Zoumplis, D., Allaway, G.P., Wild, C.T., Salzwedel, K. Virology. 2010 Jan 20;396(2):226-37]. Por lo tanto, la preparación previa a la fusión F como un antígeno de vacuna ha seguido siendo un reto. Puesto que los anticuerpos neutralizantes y de protección funcionan al interferir con el ingreso del virus, se postula que no se espera que un antígeno F que se obtiene únicamente después de los anticuerpos específicos de la fusión sea tan efectivo como un antígeno F que se obtiene previo a los anticuerpos específicos de la fusión. Por lo tanto, se considera más deseable utilizar una vacuna F que contenga un inmunógeno de proteína F en la forma previa a la fusión (o potencialmente, la forma del intermediario extendido). Los esfuerzos a la fecha no han producido una vacuna contra RSV que haya demostrado en la clínica obtener los niveles suficientes de protección para una licencia de soporte de una vacuna contra RSV. Por lo tanto, existe una necesidad para inmunógenos

derivados a partir de una proteína F de RSV que tenga propiedades mejoradas, tales como inmunogenicidad intensificada o estabilidad mejorada de la forma previa a la fusión, cuando se compara con la proteína F de RSV nativa correspondiente, así como composiciones que comprenden tal inmunógeno, tales como una vacuna.

SUMARIO DE LA INVENCION

En algunos aspectos, la presente invención proporciona mutantes de proteínas F de RSV de tipo silvestre, en donde los mutantes despliegan mutaciones introducidas en la secuencia de aminoácidos relativa a la secuencia de aminoácidos de la proteínas F de RSV de tipo silvestre correspondientes y son inmunogénicas contra la proteína F de RSV de tipo silvestre o contra un virus que comprende la proteína F de tipo silvestre. Las mutaciones de aminoácidos en los mutantes incluyen sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en relación con una proteína F de RSV de tipo silvestre.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona mutantes de una proteína F de RSV de tipo silvestre, en donde las mutaciones de aminoácidos

introducidas son mutaciones de un par de residuos de aminoácidos en una proteína F de RSV de tipo silvestre a un par de cisteínas ("mutación de disulfuro diseñada"). El par introducido de residuos de cisteína se permite para la
5 formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína que estabilizan la conformación de la proteína o estado oligomérico, tal como la conformación previa a la fusión. Ejemplos de pares específicos de tales mutaciones incluyen: 55C y 188C; 155C y 290C; 103C y 148C; y 142C y 371C,
10 tal como S55C y L188C; S155C y S290C; T103C e I148C; y L142C y N371C.

Incluso en otras modalidades, los mutantes de proteína F de RSV comprenden mutaciones de aminoácidos que son una o más mutaciones de carga de cavidad. Ejemplos de
15 aminoácidos que pueden remplazarse con el objetivo de carga de cavidad incluyen aminoácidos alifáticos pequeños (por ejemplo, Gly, Ala, y Val) o aminoácidos polares pequeños (por ejemplo, Ser y Thr) y aminoácidos que están enterrados en la conformación previa a la fusión, pero se exponen al solvente
20 después en la conformación de la fusión. Ejemplos de remplazo de aminoácidos incluyen aminoácidos alifáticos grandes (Ile, Leu y Met) o aminoácidos aromáticos grandes (His, Phe, Tyr y

Trp). En algunas modalidades específicas, el mutante de proteína F de RSV comprende una mutación de carga de cavidad seleccionada del grupo que consiste de:

- (1) sustitución de S en las posiciones 55, 62, 155,
5 190, o 290 con I, Y, L, H, o M;
- (2) sustitución de T en la posición 54, 58, 189,
219, o 397 con I, Y, L, H, o M;
- (3) sustitución de G en la posición 151 con A o H;
- (4) sustitución de A en la posición 147 o 298 con I,
10 L, H, o M;
- (5) sustitución de V en la posición 164, 187, 192,
207, 220, 296, 300, o 495 con I, Y,H; y
- (6) sustitución de R en la posición 106 con W.

En algunas modalidades particulares, un mutante de
15 proteína F de RSV comprende al menos una mutación de carga de cavidad seleccionada del grupo que consiste de:T54H, S190I, y V296I.

Incluso en otras modalidades, la presente descripción proporciona mutantes de proteína F de RSV, en
20 donde los mutantes comprenden mutaciones electrostáticas, que reducen la repulsión iónica o incrementan la atracción iónica que reside en una proteína que se encuentra próxima entre sí

en la estructura plegada. En diversas modalidades, el mutante de proteína F de RSV incluye una sustitución electrostática que reduce las interacciones iónicas de repulsión o incrementa las interacciones iónicas de atracción con los
5 residuos ácidos de Glu487 y Asp489 a partir de otro promotor del trímero F de RSV. En algunas modalidades específicas, el mutante de proteína F de RSV comprende una mutación electrostática seleccionada del grupo que consiste de:

- (1) sustitución de E en la posición 82, 92, o 487
10 por D, F, Q, T, S, L, o H;
- (2) sustitución de K en la posición 315, 394, o 399 por F, M, R, S, L, I, Q, o T;
- (3) sustitución de D en la posición 392, 486, o 489 por H, S, N, T, o P; y
- 15 (4) sustitución de R en la posición 106 o 339 por F, Q, N, o W.

Incluso en otras modalidades, la presente descripción proporciona mutantes de proteína F de RSV, que comprenden una combinación de dos o más tipos diferentes de
20 mutaciones seleccionadas a partir de mutaciones de disulfuro diseñadas, mutaciones de carga de cavidad, y mutaciones electrostáticas. En algunas modalidades particulares, la

presente invención proporciona un mutante de una proteína F de RSV de tipo silvestre, que comprende una combinación de mutaciones en relación con la proteína F de RSV de tipo silvestre correspondiente, en donde la combinación de mutaciones se selecciona del grupo que consiste de:

- (1) combinación de T103C, I148C, S190I, y D486S;
- (2) combinación de T54H S55C L188C D486S;
- (3) combinación de T54H, T103C, I148C, S190I, V296I, y D486S;
- 10 (4) combinación de T54H, S55C, L142C, L188C, V296I, y N371C;
- (5) combinación de S55C, L188C, y D486S;
- (6) combinación de T54H, S55C, L188C, y S190I;
- (7) combinación de S55C, L188C, S190I, y D486S;
- 15 (8) combinación de T54H, S55C, L188C, S190I, y D486S;
- (9) combinación de S155C, S190I, S290C, y D486S;
- (10) combinación de T54H, S55C, L142C, L188C, V296I, N371C, D486S, E487Q, y D489S; y
- 20 (11) combinación de T54H, S155C, S190I, S290C, y V296I.

En otro aspecto, la presente invención

proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican un mutante de proteína F de RSV descrito en la presente. En algunas otras modalidades específicas, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un mutante de proteína F de RSV, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:

- (1) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:8;
 - (2) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:9 ;
 - (3) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:10;
 - (4) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:11;
 - (5) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:12;
 - (6) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:13;
 - (7) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:14;
 - (8) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:15;
 - (9) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:16 ;
 - (10) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:17;
- y
- (11) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:18.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden (1) un mutante de proteína F de RSV descrito en la descripción, o (2) una molécula de ácido

nucleico o vector que codifique tal mutante de proteína F de RSV. En algunas modalidades particulares, las composiciones son composiciones farmacéuticas, que comprenden un mutante de proteína F de RSV provisto por la presente descripción y un
5 portador farmacéuticamente aceptable. En incluso otras modalidades particulares, la composición farmacéutica es una vacuna.

La presente descripción también se relaciona con el uso de un mutante de proteína F de RSV, ácidos nucleicos que
10 codifican tal mutante de proteína F de RSV, o vectores para expresar tal mutante de proteína F de RSV, o composiciones que comprenden un mutante de proteína F de RSV o ácidos nucleicos. En algunas modalidades particulares, la presente descripción proporciona un método para prevenir la infección
15 de RSV en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición farmacéutica, tal como una vacuna, que comprende un mutante de proteína F de RSV, un ácido nucleico que codifica un mutante de proteína F de RSV, o un vector que exprese un mutante de proteína F de RSV.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos

de la plantilla de polipéptido precursor (SEQ ID NO:3) utilizada para la construcción de algunos de los mutantes de proteína F de RSV descritos en los Ejemplos. El polipéptido precursor incluye una secuencia de señal (residuos 1-25),
5 polipéptido F2 (residuos 26-109), secuencia de pep27 (residuos 110-136), polipéptido F1 (residuos 137-513), un dominio de trimerización derivada de fibritina T4 (plegada; residuos 518-544), una secuencia de reconocimiento de trombina (residuos 547-552), una etiqueta de histidina
10 (residuos 553-558), un Streptag II (561-568), y secuencias de enlazador (residuos 514-517, 545-546, y 559-560). También incluye tres sustituciones de origen natural (P102A, I379V, y M447V) en relación con la secuencia F de RSV nativa establecida en SEQ ID NO:1. Los sitios de escisión de furina
15 se muestran como RARR y KKRKRR.

La Figura 2A representa la electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y el análisis de transferencia western de los mutantes F previos a la fusión seleccionados (pXCS847, pXCS851 y pXCS852) bajo
20 condiciones no reductoras.

La Figura 2B muestra las distribuciones del coeficiente de sedimentación de los mutantes seleccionados

(pXCS847, pXCS851 y pXCS852) calculadas a partir de los experimentos de velocidad de sedimentación utilizando una ultracentrífuga analítica.

Las Figuras 3A y 3B representan los espectros de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de las proteínas F de RSV modificadas ejemplares con mutaciones de sitio específico. Los espectros far-ultravioleta (UV) de CD de los mutantes designados confirmaron la integridad de la estructura secundaria, y los espectros de CD cercanos a UV confirmaron la integridad de la estructura terciaria.

La Figura 4 representa la prueba de tensión dependiente del tiempo de DS-Cav1 purificado utilizando dos anticuerpos monoclonales (mAbs) D25 y AM14 diferentes a dos temperaturas (50°C y 60°C).

La Figura 5 representa experimentos por calorimetría por barrido diferencial (DSC) con DS-Cav1 purificado (Ejemplo 8). Los experimentos se hicieron como se describe para los mutantes F previos a la fusión designados. Línea sólida - escaneo DSC inicial de la muestra, línea punteada - escaneo repetido de la misma muestra que se utilizó en el escaneo inicial. El pico de DSC se recupera en gran medida durante el escaneo repetido, indicando que la

transición conformacional detectada por la DSC es reversible.

La Figura 6A representa espectros de far-UV de CD de DS-Cav1 tensionado a 60°C (Ejemplo 8). Los espectros de CD se registraron como se describe en lo anterior para los
5 mutantes F de RSV previos a la fusión designados (Ejemplo 6). DS-Cav1 retiene el espectro de far-UV de CD definido después de hasta 2 horas de incubación a 60°C, indicando que el desdoblamiento de la proteína no global tiene lugar durante ese tiempo.

10 La Figura 6B representa espectros cerca de CD de UV de DS-Cav1 tensionado a 60°C (Ejemplo 8). Los espectros de CD se registraron como se describe en lo anterior para los mutantes F de RSV previos a la fusión designados (Ejemplo 6).

La Figura 7A representa la dependencia de
15 concentración de proteína de la Esfuerzo a la tracción térmica, como se determina por la conservación del epítipo AM14 específico al trímero F previo a la fusión (Ejemplo 8).

La Figura 7B representa la dependencia de
concentración de proteína de la Esfuerzo a la tracción
20 térmica, como se determina por la conservación del epítipo D25 específico F previo a la fusión (Ejemplo 8). Las muestras de proteína se diluyeron en serie y se sometieron a la

tensión de 50°C durante 1 hora. Se evaluó en análisis ELISA la reactividad de D25 que permaneció después de la tensión en relación con las muestras de control (no tensionadas).

La Figura 8 muestra las respuestas del anticuerpo neutralizante a partir de ratones inmunizados con DS-Cav1; F de tipo silvestre; o mutantes pXCS852, pXCS855, pXCS830, pXCS853, pXCS780, pXCS898, pXCS851, pXCS874, pXCS881, pXCS738, o pXCS847; con o sin fosfato de aluminio como adyuvante. Los resultados se reportaron como el título de la media geométrica (GMT) al 50% de 10 ratones por grupo. Cada gráfico de barrido refleja la respuesta de los ratones individuales con un total de 10 animales por grupo. La línea dentro de cada grupo indica el título del anticuerpo neutralizante al 50% de la media geométrica. "F de tipo silvestre" se refiere a un constructo recombinante de ectodominio F de tipo silvestre.

Las Figuras 9A y 9B describen correlaciones entre los títulos de anticuerpo neutralizante obtenidos por y las estabilidades de los mutantes de proteína F previos a la fusión diseñados. Eje Y - títulos de anticuerpo neutralizante obtenidos por la inmunización de los ratones con 0.25 µg de antígeno y no adyuvante o 0.025 µg de antígeno con 0.1 mg/ml

de adyuvante de AlPO₄. (Los datos se muestran en la Tabla 12).
Eje X - estabilidad de los mutantes diseñados, como se define
por la reactividad de AM14 residual después de la tensión
térmica. (Los datos se muestran en la Tabla 8B.)

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente descripción se relaciona con mutantes
de proteína F de RSV, composiciones inmunogénicas que
comprenden los mutantes de proteína F de RSV, métodos para
10 producir los mutantes de proteína F de RSV, composiciones que
comprenden los mutantes de proteína F de RSV, y ácidos
nucleicos que codifican los mutantes de proteína F de RSV.

A. DEFINICIONES

15 El término "101F" se refiere a un anticuerpo
descrito en US 2006/0159695 A1, el cual tiene un dominio
variable de cadena pesada que comprende una secuencia de
aminoácidos de SEQ ID NO:30 y un dominio variable de cadena
ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID
20 NO:31.

Como se utiliza en la presente, las formas
singulares "un", "uno" y "el", se refieren tanto al singular

como al plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "un antígeno" incluye antígenos solos o múltiples y puede considerarse equivalente a la frase "al menos un antígeno".

5 El término "adyuvante" se refiere a una sustancia capaz de intensificar, acelerar o prolongar la respuesta inmune del cuerpo del antígeno en una vacuna (aunque no sea el antígeno objetivo de la vacuna misma). Un adyuvante puede incluirse en la composición de vacuna o puede administrarse
10 por separado de la vacuna.

 El término "administración" se refiere a la introducción de una sustancia o composición en un sujeto por una vía elegida. La administración puede ser local o sistémica. Por ejemplo, si la ruta elegida es intramuscular,
15 la composición (tal como una composición que incluye un inmunógeno descrito) se administra al introducir la composición en un músculo del sujeto.

 El término "AM14" se refiere a un anticuerpo descrito en WO 2008/147196 A2, que tiene un dominio variable
20 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25.

El término "AM22" se refiere a un anticuerpo descrito en WO 2011/043643 A1, el cual tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y un dominio variable de cadena
5 ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

El término "antígeno" se refiere a una molécula que puede reconocerse por un anticuerpo. Ejemplos de antígenos incluyen polipéptidos, péptidos, lípidos, polisacáridos, y
10 ácidos nucleicos que contienen determinantes antigénicas, tales como aquellas reconocidas por una célula inmune.

El término "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las sustituciones conservadoras de
15 aminoácidos proporcionan aminoácidos funcionalmente similares que se conocen bien en la técnica. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) alanina (A), serina (S), treonina (T);
- 20 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) arginina (R), lisina (K);

5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M),
valina (V); y

6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

El término "D25" se refiere a un anticuerpo
5 descrito en WO 2008/147196 A2, que tiene un dominio variable
de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
de SEQ ID NO:22 y un dominio variable de cadena ligera que
comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23.

El término "variante degenerada" de un
10 polinucleótido de referencia se refiere a un polinucleótido
que difiere de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido
de referencia pero codifica la misma secuencia de
polipéptidos como se codifica por el polinucleótido de
referencia. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de
15 los cuales se especifican por más de un codón. Por ejemplo,
todos los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, y AGG codifican el
aminoácido arginina. De este modo, en cada posición donde se
especifica una arginina dentro de una secuencia que codifica
proteína, el codón puede alterarse a cualquiera de los
20 codones correspondientes descritos sin alterar la proteína
codificada. Debido a la degeneración del código genético, un
gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos

codifican cualquier polipéptido dado.

El término "DS-Cav1" se refiere a una versión de la proteína F de RSV que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en McLellan, et al., Science, 342(6158), 592-598,
5 2013.

El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de agente que es suficiente para generar una respuesta deseada. Por ejemplo, esta puede ser una cantidad necesaria para inhibir la replicación viral o para alterar de
10 forma mensurable los síntomas exteriores de la infección viral.

El término "epítopo" (o "determinante antigénico" o "sitio antigénico") se refiere a la región de un antígeno al cual se une o responde un anticuerpo, receptor de células B,
15 o receptor de células T. Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el pliegue secundario, terciario o cuaternario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen en la
20 exposición por solventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por pliegues de orden superior se pierden típicamente en el tratamiento con agentes desnaturizantes.

El término "polipéptido F0" (F0) se refiere al polipéptido precursor de la proteína F de RSV, que se compone de una secuencia de polipéptido de señal, una secuencia de polipéptidos F1, una secuencia de polipéptidos pep27, y una
5 secuencia de polipéptidos F2. Con raras excepciones, los polipéptidos F0 de las cepas de RSV conocidas consisten de 574 aminoácidos.

El término "polipéptido F1" (F1) se refiere a una cadena de polipéptidos de una proteína F de RSV madura. F1
10 nativo incluye aproximadamente los residuos 137-574 del precursor F0 de RSV y se compone de (de N- a C-término) una región extracelular (aproximadamente los residuos 137-524), un dominio de transmembrana (aproximadamente los residuos 525-550), y un dominio citoplásmico (aproximadamente los
15 residuos 551-574). Como se utiliza en la presente, el término abarca ambos polipéptidos F1 nativos y polipéptidos F1 que incluyen modificaciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos) a partir de la secuencia nativa, por ejemplo, modificaciones diseñadas para
20 estabilizar un mutante F o para intensificar la inmunogenicidad de un mutante F.

El término "polipéptido F2" (F2) se refiere a la

cadena de polipéptidos de una proteína F de RSV madura. F2
nativa incluye aproximadamente los residuos 26-109 del
precursor F0 de RSV. Como se utiliza en la presente, el
término abarca ambos polipéptidos F2 nativos y polipéptidos
5 F2 que incluyen modificaciones (por ejemplo, sustituciones,
inserciones o supresiones de aminoácidos) a partir de la
secuencia nativa, por ejemplo, modificaciones diseñadas para
estabilizar un mutante F o para intensificar la
inmunogenicidad de un mutante F. En la proteína f de RSV
10 nativa, el polipéptido F2 se enlaza al polipéptido F1 por dos
enlaces disulfuro para formar un heterodímero F2-F1. El
término "plegado" o "dominio plegado" se refiere a una
secuencia de aminoácidos que es capaz de formar trímeros. Un
ejemplo de tales dominios plegados es la secuencia de
15 péptidos derivada del bacteriófago de fibritina T4, la cual
tiene la secuencia de GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID
NO:40). El término "mamífero" se refiere a cualquier especie
animal de la clase Mammalia. Ejemplos de mamíferos incluyen:
humanos; primates no humanos tales como monos; animales de
20 laboratorio tales como ratas, ratones, conejillos de indias;
animales domésticos tales como gatos, perros, conejos, ganado,
ovejas, cabras, caballos, y cerdos; y animales silvestres en

cautiverio tales como leones, tigres, elefantes, y similares.

El término "glicoproteína" se refiere a una proteína que contiene cadenas de oligosacáridos (glicanos) unidas de forma covalente a cadenas laterales de polipéptidos.

5 El carbohidrato se une a la proteína en una modificación co-traductorial o post-traductorial conocida como glicosilación. El término "sitio de glicosilación" se refiere a una secuencia de aminoácidos en la superficie de un polipéptido, tal como una proteína, que acomoda la unión de un glicano. Un
10 sitio de glicosilación N-enlazado es una secuencia de triplete de NX(S/T) en la cual N es asparagina, X es cualquier residuo excepto prolina, y (S/T) es un residuo de serina o treonina. Un glicano es un polisacárido u oligosacárido. El glicano también puede utilizarse para
15 referirse a la porción carbohidrato de un glicoconjugado, tal como una glicoproteína, glicolípido, o un proteoglicano.

El término "células huésped" se refiere a células en las cuales puede propagarse un vector y expresarse su ADN o ARN. La célula puede ser procariótica o eucariótica.

20 El término "idéntico" o por ciento de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o

subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia. Los métodos de alineación de secuencias para
5 comparación se conocen bien en la técnica. Una vez alineadas, el número de coincidencias se determina al contar el número de posiciones donde un residuo de aminoácido o nucleótido idéntico se encuentra presente en ambas secuencias. El porcentaje de identidad de secuencias se determina al dividir el
10 número de coincidencias ya sea por la longitud de la secuencia establecida en la secuencia identificada, o por una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o residuos de aminoácidos consecutivos desde una secuencia establecida en una secuencia identificada), seguida al multiplicar el valor
15 resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de péptidos que tiene 1166 coincidencias cuando se alinea con una secuencia de prueba que tiene 1554 aminoácidos es 75.0 por ciento idéntica a la secuencia de prueba ($1166 \div 1554 \times 100 = 75.0$).

Puede realizarse la alineación óptima de las
20 secuencias para su comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, por el algoritmo de alineación de homología

local de Needleman y Wunsch, Mol. Biol. 48:443, 1970, por la
búsqueda del método de similaridad de Pearson y Lipman, Proc.
Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, por implementaciones
computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y
5 TFASTA en el Paquete de Software Genetics Wisconsin, Genetics
Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por
alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo,
Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4^a
ed, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2012) y Ausubel et al.
10 (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons,
New York, a través del suplemento 104 de 2013).

El término "inmunogénico" se refiere a la capacidad
de una sustancia para provocar, obtener, estimular, o inducir
una respuesta inmune contra un antígeno particular, en un
15 animal, ya sea en presencia o ausencia de un adyuvante.

El término "respuesta inmune" se refiere a
cualquier respuesta detectable de una célula o células del
sistema inmune de un mamífero huésped a un estímulo (tal como
un inmunógeno), que incluye, pero no se limita a, respuestas
20 inmunes innatas (por ejemplo, activación de la cascada de
señalización del receptor Toll), respuestas inmunes mediadas
por células (por ejemplo, respuestas mediadas por células T,

tales como células T específicas del antígeno, y células no específicas del sistema inmune), y respuestas inmunes humorales (por ejemplo, respuestas mediadas por células B, tales como generación y secreción de anticuerpos en el plasma, linfa, y/o fluidos tisulares). Ejemplos de respuestas inmunes incluyen una alteración (por ejemplo, incremento) en la activación del receptor similar a Toll, expresión o secreción de linfocina (por ejemplo, citocina (por ejemplo, tipos de citocinas Th1, Th2 o Th17) o quimiocina), activación de macrófagos, activación de células dendríticas, activación de células T (por ejemplo, células T de CD4+ o CD8+), activación de células NK, activación de células B (por ejemplo, generación y/o secreción de anticuerpos), unión de un inmunógeno (por ejemplo, antígeno (por ejemplo, polipéptido inmunogénico)) a una molécula de MHC, inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos ("CTL"), inducción de una respuesta de células B (por ejemplo, producción de anticuerpos), y expansión (por ejemplo, crecimiento de una población de células) de células del sistema inmune (por ejemplo, células T y células B), y procesamiento incrementado y presentación de células que presentan antígeno por antígeno. El término "respuesta inmune"

también abarca cualquier respuesta detectable a una sustancia particular (tal como un antígeno o inmunógeno) por uno o más componentes del sistema inmune de una vértebra animal *in vitro*. El término "inmunógeno" se refiere a un compuesto,
5 composición, o sustancia que es inmunogénica como se define más adelante en la presente.

El término "composición inmunogénica" se refiere a una composición que comprende un inmunógeno.

El término "MPE8" se refiere a un anticuerpo
10 descrito en Corti et al. [Corti, D., Bianchi, S., Vanzetta, F., Minola, A., Perez, L., Agatic, G., Lanzavecchia, A. Cross-neutralization of four paramyxoviruses por a human monoclonal antibody. *Nature*, 501(7467), 439-443 (2013)], el cual tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende
15 una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29. El término "mutante" de una proteína F de RSV de tipo silvestre, "mutante" de una proteína F de RSV, "mutante de proteína F de RSV" o "proteína
20 F de RSV modificada" se refiere a un polipéptido que despliega mutaciones introducidas en relación con una proteína F de tipo silvestre y son inmunogénicas contra la

proteína F de tipo silvestre.

El término "mutación" se refiere a una supresión, adición o sustitución de residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido cuando
5 se compara con la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido de referencia. A través de toda la especificación y reivindicaciones, la sustitución de un aminoácido en una ubicación particular en la secuencia de proteínas se denomina utilizando una notación "(residuo de aminoácidos en la
10 proteína de tipo silvestre)(posición de aminoácidos)(residuo de aminoácidos en la proteína diseñada)". Por ejemplo, una notación Y75A se refiere a una sustitución de un residuo de tirosina (Y) en la posición 75^{ava} de la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia por un residuo de
15 alanina (A) (en un mutante de la proteína de referencia). En casos donde existe variación en el residuo de aminoácidos en la misma posición entre diferentes secuencias de tipo silvestre, puede omitirse el código de aminoácidos que precede al número de posición en la notación, tal como "75A."

20 El término proteína, secuencia o polipéptido "nativo" o "de tipo silvestre", se refiere a una proteína, secuencia o polipéptido que existe naturalmente que no se ha

modificado de forma artificial por mutaciones selectivas.

El término "polipéptido pep27" o "pep27" se refiere a un polipéptido de 27 aminoácidos que se escinde desde el precursor F0 durante la maduración de la proteína F de RSV.

5 La secuencia de pep27 se flanquea por dos sitios de escisión de furina que se escinden por una proteasa celular durante la maduración de la proteína F para generar los polipéptidos F1 y F2.

El término "portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a un material o composición que, cuando se combinan con un ingrediente activo, son compatibles con el ingrediente activo y no provocan reacciones tóxicas o de otro modo no deseadas cuando se administran a un sujeto, en particular un mamífero. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen solventes, tensioactivos, agentes de suspensión, agentes reguladores, agentes lubricantes, emulsionantes, absorbentes, medios de dispersión, recubrimientos, y estabilizadores.

10
15

El término "anticuerpo específico previo a la fusión" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la glicoproteína F de RSV en una conformación previa a la fusión, pero no se une a la proteína F de RSV en una

20

conformación después de la fusión. Los anticuerpos específicos previos a la fusión ejemplares incluyen los anticuerpos D25, AM22, 5C4, MPE8, y AM14.

El término "anticuerpo específico del trímero
5 previo a la fusión" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la glicoproteína F de RSV en una conformación trimérica previa a la fusión pero no se une a la proteína F de RSV en una conformación después de la fusión o en una conformación previa a la fusión que tampoco es
10 trimérica. Un anticuerpo específico ejemplar del trímero previo a la fusión es el anticuerpo AM14. Los "anticuerpos específicos del trímero previo a la fusión" son un subconjunto de los "anticuerpos específicos previos a la fusión".

15 El término "vacunación de refuerzo principal" se refiere a un régimen de inmunoterapia que incluye la administración de una primera composición inmunogénica (la vacuna inicial) seguida por la administración de una segunda composición inmunogénica (la vacuna de refuerzo) a un sujeto
20 para inducir una respuesta inmune. La vacuna inicial y la vacuna de refuerzo contiene típicamente el mismo inmunógeno y se presentan en el mismo formato o similar. Sin embargo,

también pueden presentarse en formatos diferentes, por ejemplo, uno en forma de un vector y el otro en forma de un plásmido de ADN desnudo. El técnico experimentado entenderá un intervalo de tiempo adecuado entre la administración de la
5 vacuna inicial y la vacuna de refuerzo. Además, la vacuna inicial, la vacuna de refuerzo, o ambas de la vacuna inicial y la vacuna de refuerzo incluyen de forma adicional un adyuvante.

El término "conformación previa a la fusión" se
10 refiere a una conformación estructural adoptada por una proteína o mutante F de RSV o que puede unirse específicamente por (i) el anticuerpo D25 cuando la proteína o mutante F de RSV se encuentra en forma de un monómero o trímero, o (ii) por el anticuerpo AM14 cuando el mutante de
15 proteína F de RSV se encuentra en forma de un trímero. La conformación del trímero previo a la fusión es un subconjunto de conformaciones previas a la fusión.

El término "conformación después de la fusión" se refiere a una conformación estructural adoptada por la
20 proteína F de RSV que no se une específicamente por D25, AM22, o AM14. La proteína F nativa adopta la conformación después de la fusión posterior a la fusión de la envoltura del virus

con la membrana de la célula huésped. La proteína F de RSV también puede asumir la conformación después de la fusión fuera del contexto de un evento de fusión, por ejemplo, bajo condiciones de tensión tales como calor o baja osmolaridad, cuando se extrae desde una membrana, cuando se expresa como un ectodominio, o después del almacenamiento.

El término "proteína soluble" se refiere a una proteína capaz de disolverse en líquido acuoso y disolver el resto. La solubilidad de una proteína puede cambiar dependiendo de la concentración de la proteína en el líquido a base de agua, la condición regulada del líquido, la concentración de otros solutos en el líquido, por ejemplo, concentraciones de sal y proteína, y la temperatura del líquido.

El término "unido específicamente", en el contexto de la unión de un anticuerpo en una molécula objetivo dada, se refiere a la unión del anticuerpo con la molécula objetivo con una afinidad superior que su unión con otras sustancias probadas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F de RSV en conformación previa a la fusión es un anticuerpo que une la proteína F de RSV en conformación previa a la fusión con afinidad superior que une

a la proteína F de RSV a la conformación después de la fusión.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de agente que es suficiente para prevenir, tratar (incluyendo la profilaxis), reducir y/o
5 mejorar los síntomas y/o causas subyacentes de un trastorno.

El término "vacuna" se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inmunógeno que es capaz de obtener una respuesta inmune profiláctica o terapéutica en un sujeto. Típicamente, una vacuna obtiene una respuesta inmune
10 específica del antígeno para un antígeno de un patógeno, por ejemplo, un patógeno viral.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar o transferir una molécula de ácido nucleico extraña. El término abarca tanto vectores
15 de expresión como vectores de la transcripción. El término "vector de expresión" se refiere a un vector capaz de expresar el inserto en la célula objetivo, y generalmente contiene secuencias de control, tales como secuencias de intensificación, promoción y terminación que conducen la
20 expresión del inserto. El término "vector de transcripción" se refiere a un vector capaz de transcribirse pero no de transducirse. Los vectores de la transcripción se utilizan

para amplificar su inserción. La molécula de ácido nucleico
extraña se denomina como "inserto" o "transgen". Un vector
consiste generalmente de un inserto y una secuencia más
grande que sirve como la cadena principal del vector. Con
5 base en la estructura u origen de los vectores, los tipos
principales de vectores incluyen vectores plásmidos, vectores
cósmidos, vectores de fagos tales como el fago lambda,
vectores virales tales como vectores de adenovirus (Ad), y
cromosomas artificiales.

10

B. MUTANTES DE PROTEÍNA F DE RSV

En algunos aspectos, la presente invención
proporciona mutantes de proteínas F de RSV de tipo silvestre,
en donde los mutantes despliegan mutaciones introducidas en
15 la secuencia de aminoácidos relativa a la secuencia de
aminoácidos de la proteínas F de RSV de tipo silvestre
correspondiente y son inmunogénicas contra la proteína F de
RSV de tipo silvestre o contra un virus que comprende la
proteína F de tipo silvestre. En ciertas modalidades, los
20 mutantes F de RSV poseen ciertas características benéficas,
tales como propiedades inmunogénicas incrementadas o
estabilidad mejorada en la conformación previa a la fusión de

los mutantes o en la conformación trimérica previa a la fusión del mutante, cuando se compara con la proteína F de tipo silvestre correspondiente. Incluso en otras modalidades, la presente descripción proporciona mutantes F de RSV que
5 despliegan una o más mutaciones introducidas como se describe en la presente y se unen a un anticuerpo específico previo a la fusión seleccionada del anticuerpo D25 o anticuerpo AM14.

Las mutaciones de aminoácidos introducidas en los mutantes de proteína F de RSV incluyen sustituciones,
10 supresiones o adiciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las únicas mutaciones en la secuencia de aminoácidos de los mutantes son sustituciones de aminoácidos en relación con una proteína F de RSV de tipo silvestre.

Se conocen en la técnica secuencias de aminoácidos
15 de un gran número de proteínas F de RSV nativas a partir de subtipos de RSV diferentes, así como secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales proteínas. Por ejemplo, la secuencia de proteínas precursoras F0 de RSV de varios subtipos A, B y de bovino se establecen en SEQ ID NOs:1, 2, 4,
20 6 y 81-270.

La proteína F de RSV nativa muestra una conservación de secuencia notable a través de los subtipos de

RSV. Por ejemplo, los subtipos A y B de RSV comparten 90% de identidad de secuencia, y cada uno de los subtipos A y B de RSV comparte 81% de identidad de secuencia con la proteína F de RSV de bovino, a través de la molécula precursora F0.

5 Dentro de los subtipos de RSV, la F0 de identidad de secuencia es aún mayor; por ejemplo, dentro de cada A, B de RSV y subtipos de bovino, la proteína precursora F0 de RSV tuvo alrededor de 98% de identidad de secuencia. Estrechamente, todas las secuencias precursoras F0 de RSV

10 identificadas consisten de 574 aminoácidos de longitud, con diferencias menores de longitud típicamente debidas a la longitud de la cola citoplásmica C-terminal a partir de la identidad de secuencia a través de diversas proteínas F de RSV nativas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo,

15 WO2014/160463). Para ilustrar aún más el nivel de la conservación de secuencia de las proteínas F, los residuos de aminoácidos sin consenso F0 entre las secuencias de polipéptidos precursoras desde las cepas A de RSV y las cepas B de RSV representativas se proporcionan en las Tablas 17 y

20 18, respectivamente (donde aminoácidos sin consenso se identificaron siguiendo la alineación de las secuencias de proteína F seleccionadas a partir de las cepas A de RSV con

ClustalX (v. 2)).

En vista de la conservación sustancial de las secuencias F de RSV, una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede comparar fácilmente la posición de los aminoácidos entre las secuencias F de RSV nativa diferentes para identificar la posición de los aminoácidos F de RSV correspondientes entre las cepas y subtipos de RSV diferentes. Por ejemplo, a través de casi todas las proteínas precursoras F de RSV nativas identificadas, los sitios de escisión de furina caen en la misma posición de aminoácidos. De este modo, la conservación de las secuencias de proteínas F de RSV nativas a través de las cepas y subtipos permite el uso de una secuencia F de RSV de referencia para la comparación de los aminoácidos en posiciones particulares en la proteína F de RSV. Para los propósitos de esta descripción (a menos que el contexto lo indique de otro modo), la posición de los aminoácidos de proteína F de RSV se dan con referencia a la secuencia del polipéptido precursor F0 establecido en SEQ ID NO: 1 (la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor F nativo de longitud completa de la cepa A2 de RSV; que corresponde al identificador GenInfo GI 138251 y al identificador de la Proteína Suiza P03420). Sin embargo,

deberá observarse, y aquel con experiencia en la técnica entenderá que diferentes secuencias F0 de RSV F0 pueden tener sistemas de numeración diferentes, por ejemplo, si hay residuos de aminoácidos adicionales agregados o retirados cuando se comparan con SEQ ID NO:1. Como tal, deberá entenderse que cuando los residuos de aminoácidos específicos se denominan por su número, la descripción no se limita únicamente a los aminoácidos ubicados precisamente en aquella posición numerada cuando se cuentan desde el comienzo de una secuencia de aminoácidos dada, sino en lugar de los residuos de aminoácidos equivalentes/correspondientes en cualquiera y todas las secuencias F de RSV se pretende incluso si ese residuo no se encuentra en la misma posición precisa numerada, por ejemplo, si la secuencia de RSV es más corta o larga que SEQ ID NO:1, o tiene inserciones o supresiones cuando se compara con SEQ ID NO: 1.

B-1. Estructura de los mutantes de proteína F de RSV

Los mutantes de proteína F de RSV proporcionados por la presente descripción comprenden un polipéptido F1 y un polipéptido F2. En diversas modalidades, los mutantes además

comprenden un dominio de trimerización. En algunas modalidades, ya sea el polipéptido F1 o el polipéptido F2 incluye al menos una modificación introducida (por ejemplo, sustitución de aminoácidos) como se describe en detalle en la presente a continuación. En algunas otras modalidades, cada uno del polipéptido F1 y polipéptido F2 incluye al menos una modificación introducida (por ejemplo, sustitución de aminoácidos) como se describe en detalle en la presente a continuación.

10

B-1(a). Polipéptido F1 y polipéptido F2 de los Mutantes F de RSV

En algunas modalidades, los mutantes se encuentran en la forma madura de la proteína F de RSV, que comprende dos cadenas de polipéptidos separadas, particularmente el polipéptido F1 y el polipéptido F2. En algunas otras modalidades, el polipéptido F2 se enlaza al polipéptido F1 por uno o dos enlaces disulfuro para formar un heterodímero de polipéptidos F2-F1. Incluso en otras modalidades, los mutantes F de RSV se encuentran en forma de una proteína de cadena simple, en donde el polipéptido F2 se enlaza al polipéptido F1 por un enlace peptídico o enlazador peptídico.

20

Pueden utilizarse cualesquier enlazadores peptídicos adecuados para unir dos cadenas de polipéptidos juntas. Ejemplos de tales enlazadores incluyen las secuencias de enlazador G, GG, GGG, GS, y SAIG. El enlazador también puede
5 incluir la secuencia de pep27 de longitud completa o un fragmento de la misma.

La cadena de polipéptido F1 del mutante puede ser de la misma longitud como el polipéptido F1 de longitud completa de la proteínas F de RSV de tipo silvestre
10 correspondiente; sin embargo, también puede tener supresiones, tales como supresiones de 1 hasta 60 residuos de aminoácidos a partir del C-término del polipéptido F1 de longitud completa. Un polipéptido F1 de longitud completa de los mutantes F de RSV corresponde con las posiciones de
15 aminoácidos 137-574 del precursor F0 de RSV nativo, e incluye (de N- a C-término) una región extracelular (residuos 137-524), un dominio de transmembrana (residuos 525-550), y un dominio citoplásmico (residuos 551-574). Deberá observarse que los residuos de aminoácidos 514 hacia delante en una
20 secuencia de polipéptidos F1 nativa tiene secuencias opcionales en un polipéptido F1 de los mutantes F de RSV proporcionados en la presente, y por lo tanto puede

encontrarse ausente del polipéptido F1 del mutante.

En algunas modalidades, el polipéptido F1 de los mutantes F de RSV carece del dominio citoplásmico completo. En otras modalidades, el polipéptido F1 carece del dominio
5 citoplásmico y una porción de o todo el dominio de transmembrana completo. En algunas modalidades específicas, el mutante comprende un polipéptido F1 en donde se encuentran ausentes los residuos de aminoácidos desde la posición 510, 511, 512, 513, 514, 515, 520, 525, o 530 hasta la 574.
10 Típicamente, para mutantes que se enlazan al dominio de trimerización, tal como un pliegue, los aminoácidos 514 a 754 pueden estar ausentes. De este modo, en alguna modalidad específica, los residuos de aminoácidos 514 a 574 se encuentran ausentes del polipéptido F1 del mutante. En
15 incluso otras modalidades específicas, el polipéptido F1 de los mutantes F de RSV comprende o consiste de los residuos de aminoácidos 137-513 de una secuencia de polipéptidos F0 nativa, tal como cualquiera de la secuencia precursora F0 establecida en SEQ ID Nos: 1, 2, 4, 6, y 81-270.

20 Por otra parte, el polipéptido F1 del mutante F de RSV puede incluir un enlace C-terminal en un dominio de trimerización, tal como un pliegue. Muchas de las secuencias

de los mutantes F de RSV descritas en la presente incluyen una secuencia de sitio de escisión de proteasa, tal como el sitio de escisión de trombina (LVPRGS), etiquetas de proteína tales como 6x la etiqueta His (HHHHHH) y Streptag II (WSHPGFEEK), o secuencias de enlazador (tales como GG y GS) (véase Figura 1) que no son esenciales para la función de la proteína F de RSV, tales como para la inducción de una respuesta inmune. Una persona con experiencia en la técnica reconocerá tales secuencias, y cuando sea apropiado, entenderá que estas secuencias no se incluyen en un mutante F de RSV descrito.

En los mutantes F de RSV proporcionados por la presente descripción, la cadena de polipéptido F2 puede ser de la misma longitud que el polipéptido F2 de longitud completa de la proteínas F de RSV de tipo silvestre correspondientes; también puede tener supresiones, tales como las supresiones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 residuos de aminoácidos desde el N-término o C-término del polipéptido F2.

La forma F0 mutante (es decir, un polipéptido de cadena simple que comprende el polipéptido F2 unido al polipéptido F1 con o sin pep27 de longitud completa o parcial) o la forma del heterodímero de F1-F2 puede formar un

protómero. El mutante también puede encontrarse en forma de un trímero, que comprende tres del mismo protómero. Además, los mutantes pueden ser proteínas glicosiladas (es decir, glicoproteínas) o proteínas no glicosiladas. La forma F0
5 mutante puede incluir, o puede carecer de la secuencia del péptido de señal.

El polipéptido F1 y polipéptido F2 de los mutantes de proteína F de RSV en los cuales se introducen una o más mutaciones pueden ser de cualesquier proteínas F de RSV de
10 tipo silvestre conocidas en la técnica o descubiertas en el futuro, incluyendo sin limitaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína F de cepas de subtipo A y subtipo B de RSV, incluyendo A2 de Ontario y Buenos Aires, o cualquier otro subtipo. En algunas modalidades, el mutante F
15 de RSV comprende un polipéptido F1 y/o F2 de un virus A de RSV, por ejemplo, un polipéptido F1 y/o F2 de una proteína precursora F0 de RSV establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 2, 4, 6, y 81-270 en la cual se introducen una o más mutaciones. En algunas otras modalidades, el mutante F de RSV
20 comprende un polipéptido F1 y/o F2 de un virus B de RSV, por ejemplo, un polipéptido F1 y/o F2 de una proteína precursora F0 de RSV establecida en cualquiera de SEQ ID NOS:2, y 211-

263 en las cuales se introducen una o más mutaciones. Incluso en otras modalidades, el mutante F de RSV comprende un polipéptido F1 y/o F2 a partir de un virus RSV de bovino, por ejemplo, un polipéptido F1 y/o F2 de una proteína precursora F0 de RSV establecida en cualquiera de SEQ ID NOs:264-270 en las cuales se introducen una o más mutaciones.

En algunas modalidades, los mutantes de proteína F de RSV comprenden un polipéptido F1, un polipéptido F2, y una o más mutaciones de aminoácidos introducidas como se describe más adelante en la presente, en donde el polipéptido F1 comprende 350 aminoácidos consecutivos y es al menos 90, 95, 98, o 99 por ciento idéntico a los aminoácidos 137-513 de cualquiera de la secuencia de SEQ ID NO:1, 4, y 81-210, en donde el polipéptido F2 comprende 70 aminoácidos consecutivos y es al menos 90, 95, 98, o 99 por ciento idénticos a los aminoácidos 26-109 de cualquiera de la secuencia de SEQ ID NO:1, 4, y 81-210 y en donde mutante de proteína F de RSV se estabiliza en conformación previa a la fusión, ya sea como monómero o trímero. En algunas modalidades, el polipéptido F1 comprende 350 aminoácidos consecutivos y es al menos 90, 95, 98, o 99 por ciento idénticos a los aminoácidos 137-513 de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NOs:2, 6, y 211-263, y

el polipéptido F2 comprende 70 aminoácidos consecutivos y es al menos 90, 95, 98, o 99 por ciento idénticos a los aminoácidos 26-109 de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NOs:2, 6, y 211-263 y en algunas otras modalidades, el
5 mutante de proteína F de RSV se estabiliza en la conformación del trímero previo a la fusión.

B-1(b) Dominios de trimerización

En diversas modalidades, el mutante F de RSV
10 provisto por la presente descripción se enlaza a un dominio de trimerización. En algunas modalidades, el dominio de trimerización promueve la formación del trímero de tres heterodímeros F1/F2.

Diversos dominios de multimerización exógena que
15 promueven la formación de trímeros estables de proteína solubles se conocen en la técnica. Ejemplos de tales dominios de multimerización que pueden enlazarse a un mutante provisto por la presente descripción incluyen: (1) la cremallera de leucina GCN4 (Harbury et al. 1993 Science 262: 1401-1407); (2)
20 el motivo de trimerización de la proteína tensioactiva de pulmón (Hoppe et al. 1994 FEB S Lett 344: 191-195); (3) colágeno (McAlinden et al. 2003 Biol Chem 278:42200-42207); y

(4) el pliegue de fibritina T4 de fago (Miroshnikov et al. 1998 Protein Eng 11:329-414). En algunas modalidades, un dominio plegado se enlaza a un mutante F en el C-término del polipéptido F1. En modalidades específicas, el dominio
5 plegado es un dominio plegado de fibritina T4, tales como la secuencia de aminoácidos GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 40).

Típicamente, el dominio de multimerización se coloca C-terminal en el polipéptido F1. Puede unirse
10 directamente en la cadena de polipéptido F1. Opcionalmente, el dominio de multimerización se conecta con el polipéptido F1 mediante un enlazador, tal como un enlazador aminoácido, por ejemplo, la secuencia GG, GS, o SAIG. El enlazador también puede ser un enlazador más largo (por ejemplo,
15 incluyendo la secuencia de repetición GG). Se conocen en la técnica numerosos enlazadores neutros de forma conformacional que pueden utilizarse en los mutantes proporcionados por la presente descripción. En algunas modalidades, el mutante F comprende un dominio plegado que incluye un sitio de escisión
20 de proteasa para retirar el dominio plegado del polipéptido F1, tal como un sitio de trombina entre el polipéptido F1 y el dominio plegado.

B-2.Mutaciones introducidas en los mutantes de proteína F de RSV

Los mutantes F de RSV proporcionados por la presente descripción comprenden un polipéptido F1 y un
5 polipéptido F2, en donde (1) ya sea el polipéptido F1 o (2) el polipéptido F2, o (3) ambos del polipéptido F1 y polipéptido F2 incluyen una o más mutaciones de aminoácidos introducidas relativas a la secuencia de aminoácidos de la proteína F nativa correspondiente. La introducción de tales
10 mutaciones de aminoácidos en los mutantes F de RSV confiere una propiedad benéfica a los mutantes, tales como inmunogenicidad intensificada, estabilidad mejorada, o formación o estabilidad mejorada de cierta forma física deseada o conformación de los mutantes. Tales mutaciones de
15 aminoácidos introducidas se denominan como "mutaciones de enlace disulfuro diseñadas", "mutaciones de carga de cavidad", o "mutaciones electrostáticas", y se describen en detalle en la presente a continuación. Los mutantes F de RSV que incluyen cualesquier mutaciones adicionales también se
20 abarcan por la invención siempre y cuando la propiedad inmunogénica de los mutantes no se afecte sustancialmente de forma adversa por las mutaciones adicionales.

B-2(a) Mutaciones de Enlace Disulfuro Diseñadas

En algunas modalidades, los mutantes F de RSV proporcionados por la presente descripción incluyen una o más mutaciones de enlace disulfuro diseñadas. El término "mutación de enlace disulfuro diseñada" se refiere a la mutación de un par de residuos de aminoácidos en una proteína F de RSV de tipo silvestre en un par de residuos de cisteína. El par introducido de residuos de cisteína se permite para la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína introducidos, en los cuales el enlace disulfuro sirve para estabilizar la conformación de las proteínas o estado oligomérico, tal como la conformación previa a la fusión. Para estabilizar la conformación previa a la fusión del mutante, los pares de residuos para la mutación una cisteína deben encontrarse en proximidad cercana a la conformación previa a la fusión pero distante de la conformación después de la fusión. Tales residuos pueden identificarse por el método adecuado conocido en la técnica, tal como por inspección visual de una estructura de cristal de F de RSV en una conformación previa a la fusión, o una selección más cuantitativa utilizando un software de diseño

de proteínas por computadora (tal como BioLuminate™ [BioLuminate, Schrodinger LLC, Nueva York, 2015], Discovery Studio™ [Discovery Studio Modeling Environment, Accelrys, San Diego, 2015], MOE™ [Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, 2015], y Rosetta™ [Rosetta, University of Washington, Seattle, 2015]). De preferencia, la distancia ente el par de residuos (por ejemplo, los carbonos beta) es menor que 8 Å en una conformación previa a la fusión, pero mayor que 20 Å en una conformación después de la fusión.

10 En algunas modalidades, los mutantes de proteína F de RSV comprenden únicamente una mutación de disulfuro diseñada ("mutación simple de disulfuro diseñada"). En algunas otras modalidades, los mutantes de proteína F de RSV comprenden al menos dos mutaciones de disulfuro diseñadas, en
15 donde cada par de residuos de cisteína de la mutación de disulfuro diseñadas se coloca de forma apropiada cuando el mutante de proteína F de RSV se encuentra en conformación previa a la fusión ("doble mutación de disulfuro diseñada").

 En algunas modalidades específicas, la presente
20 descripción proporciona un mutante F de RSV que comprende al menos una mutación de enlace disulfuro diseñada, en donde el mutante comprende las mismas mutaciones introducidas que se

encuentran en cualquiera de los mutantes ejemplares proporcionados en las Tablas 1 y 4 - 6. Los mutantes F de RSV ejemplares proporcionados en las Tablas 1 y 4-6 se basan en la misma secuencia F0 nativa de la cepa A2 de RSV con tres
5 sustituciones de origen natural en las posiciones 102, 379, y 447 (SEQ ID NO:3). Las mismas mutaciones introducidas en cada uno de los mutantes pueden hacerse en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV para llegar a diferentes mutantes F de RSV, tales como
10 una secuencia de polipéptidos F0 nativa establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, y 81-270. Los mutantes F de RSV que se basan en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV y comprenden cualquiera de las mutaciones de disulfuro
15 diseñadas también se encuentran dentro del alcance de la invención. En algunas modalidades particulares, un mutante de proteína F de RSV comprende al menos una mutación de disulfuro diseñada seleccionado del grupo que consiste de: 55C y 188C; 155C y 290C; 103C y 148C; y 142C y 371C, y tales
20 como S55C y L188C, S155C y S290C, T103C y I148C, o L142C y N371C.

En algunas modalidades, la presente descripción

proporciona mutantes de proteína F de RSV, en donde las mutaciones de aminoácidos son mutaciones de un par de residuos de aminoácidos en la región HRB (aproximadamente los aminoácidos 476 - 524) de una proteína F de RSV en un par de

5 cisteínas. El par introducido de residuos de cisteína se permite para la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína a partir de dos protómeros mutantes de F2-F1 adyacentes de un trímero. El disulfuro que enlaza dos protómeros en un trímero sirve para estabilizar el mutante en

10 una etapa trimérica. Ejemplos de pares específicos de tales mutaciones incluyen: 508C y 509C; 515C y 516C; 522C y 523C, tales como K508C y S509C, N515C y V516C, o T522C y T523C. En algunas modalidades, los mutantes F de RSV comprenden (1) al menos un par de mutaciones de cisteína en la región HRB y (2)

15 al menos una mutación introducida fuera de la región HRB seleccionada de una mutación de enlace disulfuro diseñada como se describe en la presente en lo anterior, una mutación de carga de cavidades descrita más adelante en la presente, una mutación electrostática como se describe más adelante en

20 la presente, o una combinación de cualquiera de estas mutaciones.

B-2(b) Mutaciones de carga de cavidad.

En otras modalidades, la presente descripción proporciona mutantes F de RSV que comprenden una o más mutaciones de carga de cavidad. El término "mutación de carga de cavidad" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido en la proteína F de RSV de tipo silvestre por un aminoácido que se espera cargue una cavidad interna de la proteína F madura de RSV. En una aplicación, tales mutaciones de carga de cavidad contribuyen a estabilizar la conformación previa a la fusión de un mutante de proteína F de RSV. Las cavidades en la conformación previa a la fusión de la proteína F de RSV pueden identificarse por métodos conocidos en la técnica, tales como por inspección visual de una estructura de cristal de F de RSV en una conformación previa a la fusión, o al utilizar un software de diseño de proteínas por computadora (tal como BioLuminateTM [BioLuminate, Schrodinger LLC, Nueva York, 2015], Discovery StudioTM [Discovery Studio Modeling Environment, Accelrys, San Diego, 2015], MOETM [Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, 2015], y RosettaTM [Rosetta, University of Washington, Seattle, 2015]). Los aminoácidos que se remplazan por mutaciones de carga de cavidad incluyen

típicamente aminoácidos alifáticos pequeños (por ejemplo, Gly, Ala, y Val) o aminoácidos polares pequeños (por ejemplo, Ser y Thr). También pueden incluir aminoácidos que están enterrados en la conformación previa a la fusión, pero que se exponen al solvente en la conformación posterior. Los aminoácidos de remplazo pueden ser aminoácidos alifáticos grandes (Ile, Leu y Met) o aminoácidos aromáticos grandes (His, Phe, Tyr y Trp). Por ejemplo, en diversas modalidades, el mutante de proteína F de RSV incluye una mutación T54H.

En algunas modalidades específicas, un mutante de proteína F de RSV comprende una o más mutaciones de carga de cavidad seleccionadas del grupo que consiste de:

- 1) sustitución de S en las posiciones 55, 62, 155, 190, o 290 con I, Y, L, H, o M;
- 2) sustitución de T en la posición 54, 58, 189, 219, o 397 con I, Y, L, H, o M;
- 3) sustitución de G en la posición 151 con A o H;
- 4) sustitución de A en la posición 147 o 298 con I, L, H, o M;
- 5) sustitución de V en la posición 164, 187, 192, 207, 220, 296, 300, o 495 con I, Y, H; y
- 6) sustitución de R en la posición 106 con W.

En algunas modalidades específicas, la presente descripción proporciona un mutante F de RSV que comprende una o más mutaciones de carga de cavidad, en donde el mutante comprende las mutaciones de carga de cavidad en cualquiera de los mutantes proporcionados en las Tablas 2, 4, y 6. Los mutantes F de RSV proporcionados en las Tablas 2, 4, y 6 se basan en la misma secuencia F0 nativa de la cepa A2 de RSV con tres sustituciones de origen natural en las posiciones 102, 379, y 447 (SEQ ID NO:3). Las mismas mutaciones introducidas en cada uno de los mutantes puede hacerse en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV para llegar a diferentes mutantes F de RSV, tales como una secuencia de polipéptidos F0 nativa establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 2, 4, 6, y 81-270. Los mutantes F de RSV que se basan en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV y comprenden cualquiera de una o más mutaciones de carga de cavidad también se encuentran dentro del alcance de la invención. En algunas modalidades particulares, un mutante de proteína F de RSV provisto por la presente descripción comprende al menos una mutación de carga de cavidad seleccionada del grupo que consiste de:T54H, S190I, y V296I.

B-2 (c) Mutaciones electrostáticas.

Incluso en otras modalidades, la presente descripción proporciona mutantes de proteína F de RSV que incluyen una o más mutaciones electrostáticas. El término

5 "mutación electrostática" se refiere a una mutación de aminoácido introducida en una proteína F de RSV de tipo silvestre que reduce la repulsión iónica o incrementa la atracción iónica entre los residuos de una proteína que se encuentran próximos entre sí en la estructura plegada. Como

10 el enlace de hidrógeno es un caso especial de atracción iónica, las mutaciones electrostáticas pueden incrementar enlaces de hidrógeno entre tales residuos próximos. En un ejemplo, puede introducirse una mutación electrostática para mejorar la estabilidad del trímero. En algunas modalidades,

15 una mutación electrostática se introduce para reducir las interacciones iónicas de repulsión o incrementar las interacciones iónicas de atracción (que incluyen potencialmente enlaces de hidrógeno) entre los residuos que se encuentran en proximidad cercana en la glicoproteína F de

20 RSV en su conformación previa a la fusión pero no a su conformación después de la fusión. Por ejemplo, en la conformación previa a la fusión, la cadena lateral ácida de

Asp486 de un protómero del trímero de glicoproteína F de RSV se ubica en la interconexión del trímero y se estratifica de forma estructural entre otras dos cadenas laterales ácidas de Glu487 y Asp489 a partir de otro protómero. Por otra parte, 5 en la conformación después de la fusión, la cadena lateral ácida de Asp486 se ubica en la superficie del trímero y se expone al solvente. En diversas modalidades, el mutante de proteína F de RSV incluye una sustitución D486S electrostática que reduce las interacciones iónicas de repulsión o incrementa las interacciones iónicas de atracción 10 con los residuos ácidos de Glu487 y Asp489 a partir de otro protómero del trímero F de RSV. Típicamente, la introducción de una mutación electrostática incrementará la temperatura de fusión (T_m) de la conformación previa a la fusión o la conformación del trímero previa a la fusión de la proteína F 15 de RSV.

Las interacciones electrostáticas desfavorables en una conformación previa a la fusión o la conformación del trímero previa a la fusión pueden identificarse por un método 20 conocido en la técnica, tal como por inspección visual de una estructura de cristal de F de RSV en una conformación previa a la fusión o conformación del trímero previa a la fusión, o

al utilizar un software de diseño de proteínas por computadora (tal como BioLuminate™ [BioLuminate, Schrodinger LLC, Nueva York, 2015], Discovery Studio™ [Discovery Studio Modeling Environment, Accelrys, San Diego, 2015], MOE™
5 [Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, 2015], y Rosetta™ [Rosetta, University of Washington, Seattle, 2015]).

En algunas modalidades específicas, el mutante de proteína F de RSV comprende al menos una mutación
10 electrostática seleccionada del grupo que consiste de:

- 1) sustitución de E en la posición 82, 92, o 487 por D, F, Q, T, S, L, o H;
- 2) sustitución de K en la posición 315, 394, o 399 por F, M, R, S, L, I, Q, o T;
- 15 3) sustitución de D en la posición 392, 486, o 489 por H, S, N, T, o P; y
- 4) sustitución de R en la posición 106 o 339 por F, Q, N, o W.

En algunas modalidades específicas, la presente
20 descripción proporciona un mutante F de RSV que comprende una o más mutaciones electrostáticas, en donde el mutante comprende las mutaciones electrostáticas en cualquiera de los

mutantes proporcionados en las Tablas 3, 5, y 6. Los mutantes F de RSV proporcionados en las Tablas 3, 5, y 6 se basan en la misma secuencia F0 nativa de la cepa A2 de RSV con tres sustituciones de origen natural en las posiciones 102, 379, y 447 (SEQ ID NO:3). Las mismas mutaciones introducidas en cada uno de los mutantes pueden hacerse en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV para llegar a diferentes mutantes F de RSV, tal como una secuencia de polipéptidos F0 nativa establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 2, 4, 6, y 81-270. Los mutantes F de RSV que se basan en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV y comprenden cualquiera de una o más mutaciones electrostáticas que también se encuentran dentro del alcance de la invención. En algunas modalidades particulares, el mutante de proteína F de RSV comprende la mutación D486S.

B-2 (d) Combinación de Mutaciones de enlace disulfuro diseñadas, Mutaciones de carga de cavidad, y Mutaciones electrostáticas.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona mutantes de proteína F de RSV, las cuales

comprenden una combinación de dos o más tipos diferentes de mutaciones seleccionadas a partir de mutaciones de enlace disulfuro diseñadas, mutaciones de carga de cavidad, y mutaciones electrostáticas, cada una como se describe en la presente en lo anterior.

En algunas modalidades, los mutantes comprenden al menos una mutación de enlace disulfuro diseñada y al menos una mutación de carga de cavidad. En algunas modalidades específicas, los mutantes F de RSV incluyen una combinación de mutaciones como se observa en la Tabla 4.

En algunas modalidades adicionales, los mutantes de proteína F de RSV comprenden al menos una mutación de disulfuro diseñada y al menos una mutación electrostática. En algunas modalidades específicas, los mutantes F de RSV incluyen una combinación de mutaciones como se observa en la Tabla 5.

Incluso en otras modalidades, los mutantes de proteína F de RSV comprenden al menos una mutación de disulfuro diseñada, al menos una mutación de carga de cavidad, y al menos una mutación electrostática. En algunas modalidades específicas, los mutantes F de RSV incluyen una combinación de mutaciones como se proporciona en la Tabla 6.

En algunas modalidades particulares, la presente invención proporciona un mutante F de RSV que comprende una combinación de mutaciones seleccionada del grupo que consiste de:

- 5 (1) combinación de T103C, I148C, S190I, y D486S;
- (2) combinación de T54H S55C L188C D486S;
- (3) combinación de T54H, T103C, I148C, S190I, V296I,
 y D486S;
- (4) combinación de T54H, S55C, L142C, L188C, V296I,
10 y N371C;
- (5) combinación de S55C, L188C, y D486S;
- (6) combinación de T54H, S55C, L188C, y S190I;
- (7) combinación de S55C, L188C, S190I, y D486S;
- (8) combinación de T54H, S55C, L188C, S190I, y
15 D486S;
- (9) combinación de S155C, S190I, S290C, y D486S;
- (10) combinación de T54H, S55C, L142C, L188C, V296I,
 N371C, D486S, E487Q, y D489S; y
- (11) combinación de T54H, S155C, S190I, S290C, y
20 V296I.

En algunas modalidades específicas, la presente descripción proporciona un mutante F de RSV que comprende una

combinación de mutaciones introducidas, en donde el mutante comprende una combinación de mutaciones en cualquiera de los mutantes proporcionados en las Tablas 4, 5, y 6. Los mutantes F de RSV proporcionados en las Tablas 4, 5, y 6 se basan en la misma secuencia F0 nativa de la cepa A2 de RSV con tres sustituciones de origen natural en las posiciones 102, 379, y 447 (SEQ ID NO:3). Las mismas mutaciones introducidas en cada uno de los mutantes pueden hacerse en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV para llegar a diferentes mutantes F de RSV, tales como una secuencia de polipéptidos F0 nativa establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 2, 4, 6, y 81-270. Los mutantes F de RSV se basan en una secuencia de polipéptidos F0 nativa de cualquier otro subtipo o cepa de RSV y comprenden cualquiera de la combinación de mutaciones que también se encuentran dentro del alcance de la invención.

En algunas otras modalidades particulares, la presente invención proporciona un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una cisteína (C) en la posición 103 (103C) y en la posición 148 (148C), una isoleucina (I) en la posición 190 (190I), y una serina (S) en la posición 486 (486S), y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y

un polipéptido F2 seleccionado del grupo que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42;

5 (2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
10 ID NO:42;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:44;

20 (5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48;

10 (8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:48;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
20 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:279 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:280;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:279 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:280;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:281 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:282;

15 (14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:281 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:282;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:283 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:284;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:283 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:284;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:285 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:286;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:285 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:286;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:287 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:288;

20 (20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:287 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:288;

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:289 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:290; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:289 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:290.

En algunas otras modalidades particulares, la presente invención proporciona un mutante F de RSV, en donde
15 el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, a cisteína (C) en las posiciones 103 y 148, una isoleucina (I) en las posiciones 190 y 296, y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionado del grupo que consiste de:

20 (1) polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54;

10 (4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:54;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

20 (6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

15 (10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:60;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:294;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:294;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:295 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:296;

20 (16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:295 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:296;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:297 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:298;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:297 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:298;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:299 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:300;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:299 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:300;

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:301 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:302; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:301 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:302.

En algunas otras modalidades particulares, la
10 presente invención proporciona un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 55 y 188, y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionado del grupo que
15 consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
20 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66;
20

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:303 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:304;

20 (12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:303 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:304;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:305 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:306;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:305 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:306;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:307 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:308;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:307 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:308;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:309 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:310;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:309 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:310;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
10 de aminoácidos de SEQ ID NO:311 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:312;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:311 y un polipéptido F1
15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:312.

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:313 y un polipéptido F1 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:314; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:313 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:314.

5 En algunas otras modalidades particulares, la presente invención proporciona un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 55 y 188, una isoleucina (I) en la posición 190 (190I), y una serina (S) en la posición
10 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionado del grupo que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72;

15 (2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:72;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78;

20 (8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:315 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:316;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:315 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:316;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:317 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:317 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
10 de aminoácidos de SEQ ID NO:319 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:319 y un polipéptido F1
15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:321 y un polipéptido F1 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:322;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:321 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:322;

5 (19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:323 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:324;

 (20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:323 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:324.

 (21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
15 de aminoácidos de SEQ ID NO:325 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326; y

 (22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:325 y un polipéptido F1
20 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido F2 y el polipéptido F1 de los mutantes F de RSV ejemplares proporcionados por la presente descripción se proporcionan en las Tablas 19-22.

5 En diversas modalidades un dominio plegado se enlaza a un mutante F de RSV descrito en la presente en lo anterior, en donde el dominio plegado se enlaza en el C-término del polipéptido F1 y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40.

10 Los mutantes de proteína F de RSV proporcionados por la presente descripción pueden prepararse por métodos conocidos de rutina en la técnica, tales como por la expresión en un sistema huésped recombinante que utiliza un vector adecuado. Las células huésped recombinantes incluyen,
15 por ejemplo, células de insecto, células de mamífero, células de aviar, bacterias, y células de levadura. Ejemplos de células de insecto adecuadas incluyen, por ejemplo, células Sf9, células Sf21, células Tn5, células S2 de Schneider, y células High Five (un aislado de clonación derivado de la
20 línea celular progenitora ni BTI-TN-5B1-4 de Trichoplusia (Invitrogen)). Ejemplos de células de mamífero adecuadas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células de

riñón embrionario de humano (células HEK293 o Expi 293, transformadas típicamente por ADN de tipo 5 de adenovirus recortado), células NIH-3T3, células 293-T, células Vero, y células HeLa. Las células de aviar adecuadas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx.RTM), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo, fibroblastos de codorniz (por ejemplo, ELL-O), y células de pato. Los sistemas adecuados de expresión de células de insecto, tales como sistemas en vectores de baculovirus, se conocen por aquellos con experiencia 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 los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto se encuentran comercialmente disponibles en forma de kit a partir de, inter alia, Invitrogen, San Diego Calif. Los sistemas de expresión de células aviares también se conocen por aquellos con experiencia 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. De forma similar, los sistemas de expresión en células bacterianas y de mamíferos también se conocen en la técnica y se describen

por ejemplo en, Yeast Genetic Engineering (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, Londres.

Se conoce bien un número de vectores adecuados para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto o mamífero y convencionales en la técnica. Los vectores adecuados pueden contener un número de componentes, que incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: un origen de la replicación; un gen marcador que se selecciona; uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor, un intensificador, un terminador), y/o una o más señales de transducción; y una secuencia de señal o secuencia líder para dirigir en la ruta secretora en una célula huésped seleccionada (por ejemplo, de especies de origen de mamífero o heterólogas de mamífero o que no son de mamífero). Por ejemplo, para la expresión en células de insecto se utiliza un vector de expresión de baculovirus adecuado, tal como pFastBac (Invitrogen), para producir partículas de baculovirus recombinantes. Las partículas de baculovirus se amplifican y utilizan para infectar células de insecto para expresar la proteína recombinante. Para la expresión en células de mamífero, se utiliza un vector que

conducirá la expresión del constructo en la célula huésped de mamífero deseada (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).

Los polipéptidos mutantes de proteína F de RSV
5 pueden purificarse utilizando cualesquier métodos adecuados. Por ejemplo, se conocen en la técnica métodos para purificar los polipéptidos mutantes de proteína F de RSV por cromatografía de inmunoafinidad. Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004). Los métodos adecuados para
10 purificar las proteínas deseadas que incluyen precipitación y diversos tipos de cromatografía, tales como de interacción hidrofóbica, intercambio iónico, afinidad, de quelación y de exclusión de tamaños se conocen bien en la técnica. Los esquemas de purificación adecuados pueden crearse utilizando
15 dos o más de estos u otros métodos adecuados. Si se desea, los polipéptidos mutantes de proteína F de RSV pueden incluir una "etiqueta" que facilite la purificación, tal como una etiqueta de epítipo o una etiqueta de histidina (HIS). Tales polipéptidos etiquetados pueden purificarse de forma
20 conveniente, por ejemplo, a partir de un medio acondicionado, por cromatografía de quelación o cromatografía de afinidad.

C. ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN MUTANTES DE
PROTEÍNA F DE RSV

En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican un mutante de
5 proteína F de RSV descrito en la presente en lo anterior. Estas moléculas de ácidos nucleicos incluyen secuencias de ADN, ADNc, y ARN. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican únicamente un polipéptido F2 o únicamente un polipéptido F1 de un mutante F de RSV también se abarcan por
10 la invención. La molécula de ácido nucleico puede incorporarse en un vector, tal como un vector de expresión.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F0 precursor que, cuando se expresa en una célula apropiada, se procesa en un mutante F
15 de RSV descrito. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F0 precursor que, cuando se expresa en una célula apropiada, se procesa en un mutante F de RSV descrito, en donde el polipéptido F0 precursor incluye de N- to C- término, un péptido de señal, un polipéptido F2,
20 un polipéptido Pep27, y un polipéptido F1. En algunas modalidades, el polipéptido Pep27 comprende la secuencia de aminoácidos establecida como las posiciones 110-136 de

cualquiera de SEQ ID NOs:1, 2, 4, 6, y 81-270, en donde las posiciones de aminoácidos corresponden con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunas modalidades, el péptido de señal comprende la secuencia de aminoácidos establecida como las posiciones 1-25 de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, y 81-270, en donde las posiciones de aminoácidos corresponden con la secuencia de aminoácidos de una referencia de SEQ ID NO:1.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico codifica un mutante seleccionado del grupo que consiste de:

- (1) un mutante que comprende al menos una mutación de disulfuro diseñada;
- (2) un mutante que comprende al menos una mutación de carga de cavidad;
- (3) un mutante que comprende al menos una mutación electrostática;
- (4) un mutante que comprende al menos una mutación de disulfuro diseñada y al menos una mutación de carga de cavidad;
- (5) un mutante que comprende al menos una mutación de disulfuro diseñada y al menos una mutación electrostática;

(6) un mutante que comprende al menos una mutación de carga de cavidad y al menos una mutación electrostática; y

(7) un mutante que comprende al menos una mutación de disulfuro diseñada y al menos una mutación electrostática,
5 al menos una mutación de carga de cavidad, y al menos una mutación electrostática.

En algunas modalidades específicas, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un mutante seleccionado del grupo que consiste de:

10 (1) un mutante que comprende una combinación de sustituciones 103C, 148C, 190I, y 486S;

(2) un mutante que comprende una combinación de sustituciones 54H, 55C, 188C, y 486S;

(3) un mutante que comprende una combinación de
15 sustituciones 54H, 103C, 148C, 190I, 296I, y 486S;

(4) un mutante que comprende una combinación de sustituciones 54H, 55C, 142C, 188C, 296I, y 371C;

(5) un mutante que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos 55C, 188C, y 486S;

20 (6) un mutante que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 55C, 188C, y 190I;

(7) un mutante que comprende una combinación de

sustituciones de aminoácidos 55C, 188C, 190I, y 486S;

(8) un mutante que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 55C, 188C, 190I, y 486S;

(9) un mutante que comprende una combinación de
5 sustituciones de aminoácidos 155C, 190I, 290C, y 486S;

(10) un mutante que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 55C, 142C, 188C, 296I, 371C, 486S, 487Q, y 489S; y

(11) una combinación de sustituciones de
10 aminoácidos 54H, 155C, 190I, 290C, y 296I.

En algunas modalidades particulares, la molécula de ácido nucleico codifica un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una cisteína (C) en la posición 103 (103C) y en la posición 148 (148C), una isoleucina (I) en la
15 posición 190 (190I), y una serina (S) en la posición 486 (486S), y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un polipéptido F1 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42;

5 (3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44;

 (4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44;

 (5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
15 de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46;

 (6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48;

5 (8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48;

10 (9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
20 de aminoácidos de SEQ ID NO:279 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:280;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia

de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:279 y un polipéptido F1
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
5 ID NO:280;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO:281 y un polipéptido F1 que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:282;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
10 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:281 y un polipéptido F1
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:282;

15 (15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO:283 y un polipéptido F1 que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:284;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:283 y un polipéptido F1
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:284;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:285 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:286;

5 (18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:285 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
10 ID NO:286;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:287 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:288;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:287 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:288;

20 (21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:289 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:290; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:289 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:290.

En algunas otras modalidades particulares, la molécula de ácido nucleico codifica un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición
10 54, una cisteína (C) en las posiciones 103 y 148, una isoleucina (I) en las posiciones 190 y 296, y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo que consiste de:

15 (1) polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:52;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54;

5 (4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
10 ID NO:54;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:56;

20 (7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

10 (10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:60;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
20 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:294;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:294;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:295 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:296;

15 (16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:295 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:296;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:297 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:298;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:297 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:298;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:299 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:300;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:299 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:300;

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:301 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:302; y

20 (22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:301 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:302.

En algunas otras modalidades particulares, la
5 molécula de ácido nucleico codifica un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 55 y 188, y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo
10 que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
20 de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66;

10 (6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:66;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
20 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:303 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:304;

15 (12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:303 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:304;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:305 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:306;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:305 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:306;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:307 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:308;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:307 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:308;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:309 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:310;

20 (18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:309 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:310;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:311 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:312;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:311 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:312.

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:313 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:314; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:313 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:314.

En algunas otras modalidades particulares, la

molécula de ácido nucleico codifica un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 55 y 188, una isoleucina (I) en la posición 190 (190I), y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
10 de aminoácidos de SEQ ID NO:315 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:316;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:315 y un polipéptido F1
15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:316;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:317 y un polipéptido F1 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:317 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318;

5 (15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:319 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320;

 (16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:319 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320;

 (17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
15 de aminoácidos de SEQ ID NO:321 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:322;

 (18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:321 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:322;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:323 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:324;

5 (20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:323 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:324.

10 (21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:325 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:325 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326.

En algunas modalidades específicas, la presente
20 descripción proporciona una molécula de ácido nucleico, que codifica un mutante seleccionado del grupo que consiste de:

(1) un mutante que comprende los aminoácidos 26-513

de SEQ ID NO:19;

(2) un mutante que comprende los aminoácidos 26-513
de SEQ ID NO:20; y

(3) un mutante que comprende los aminoácidos 26-513
5 de SEQ ID NO:21.

En algunas otras modalidades específicas, la
presente descripción proporciona una molécula de ácido
nucleico que codifica un mutante de proteína F de RSV, o una
variante degenerada del mismo, en donde la molécula de ácido
10 nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada
del grupo que consiste de:

(1) una secuencia de nucleótidos que comprende los
nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:8;

(2) una secuencia de nucleótidos que comprende los
15 nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:9 ;

(3) una secuencia de nucleótidos que comprende los
nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:10;

(4) una secuencia de nucleótidos que comprende los
nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:11;

20 (5) una secuencia de nucleótidos que comprende los
nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:12;

(6) una secuencia de nucleótidos que comprende los

nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:13;

(7) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:14;

(8) una secuencia de nucleótidos que comprende los
5 nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:15;

(9) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:16;

(10) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:17; y

10 (11) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 76-1539 de SEQ ID NO:18.

D. COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN UN MUTANTE DE PROTEÍNA F DE RSV; COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN UN ÁCIDO
15 NUCLEICO QUE CODIFICA UN MUTANTE DE PROTEÍNA F DE RSV

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden (1) un mutante de proteína F de RSV descrito en la descripción, o (2) una molécula de ácido nucleico o vector que codifique tal mutante de proteína F de
20 RSV.

En algunas modalidades, la composición es una composición inmunogénica capaz de obtener una respuesta

inmune contra la proteína F de RSV en un sujeto. En algunas modalidades particulares, la composición inmunogénica es una composición farmacéutica, que comprende un mutante de proteína F de RSV proporcionada por la presente descripción y
5 un portador farmacéuticamente aceptable.

Incluso en otras modalidades, la composición farmacéutica es una vacuna. El componente inmunogénico en la vacuna puede ser (1) un mutante de proteína F de RSV descrito en la descripción, (2) un ácido nucleico que codifica tal
10 mutante de proteína F de RSV, o (3) un vector para expresar tal mutante de proteína F de RSV.

En algunas modalidades particulares, la vacuna comprende un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una cisteína (C) en la posición 103 (103C) y en la posición
15 148 (148C), una isoleucina (I) en la posición 190 (190I), y una serina (S) en la posición 486 (486S), y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionado del grupo que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
20 de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia

de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y un polipéptido F1
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
5 ID NO:42;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y un polipéptido F1 que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
10 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y un polipéptido F1
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:44;

15 (5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y un polipéptido F1 que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45 y un polipéptido F1
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:46;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48;

5 (8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
10 ID NO:48;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:50.

20 (11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:279 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:280;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:279 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:280;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:281 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:282;

10 (14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:281 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:282;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:283 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:284;

20 (16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:283 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:284;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:285 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:286;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:285 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:286;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:287 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:288;

15 (20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:287 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:288;

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:289 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:290; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:289 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:290.

En algunas otras modalidades particulares, la vacuna comprende un mutante F de RSV, en donde el mutante
10 comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 103 y 148, una isoleucina (I) en las posiciones 190 y 296, y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo que consiste de:

15 (1) polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:52;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54;

5 (4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
10 ID NO:54;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
ID NO:56;

20 (7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

10 (10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292;

20 (12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:291 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:292;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:294;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:293 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:294;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:295 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:296;

15 (16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:295 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:296;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:297 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:298;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:297 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:298;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:299 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:300;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:299 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:300;

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:301 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:302; y

20 (22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:301 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:302.

En algunas otras modalidades particulares, la
5 vacuna comprende un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 55 y 188, y una serina (S) en la posición 486, y en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo que consiste
10 de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62;

(2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
20 de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66;

10 (6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:66;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia
20 de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:303 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:304;

15 (12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:303 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:304;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:305 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:306;

(14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:305 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:306;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:307 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:308;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:307 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:308;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:309 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:310;

20 (18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:309 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:310;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:311 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:312;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:311 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:312.

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:313 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:314; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:313 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:314.

En algunas otras modalidades particulares, la

vacuna comprende un mutante F de RSV, en donde el mutante comprende una histidina (H) en la posición 54, una cisteína (C) en las posiciones 55 y 188, una isoleucina (I) en la posición 190 (190I), y una serina (S) en la posición 486, y
5 en donde el mutante comprende un polipéptido F1 y un polipéptido F2 seleccionados del grupo que consiste de:

(1) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72;

10 (2) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO:72;

(3) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74;

20 (4) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74;

(5) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y un polipéptido F1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76;

(6) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
10 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76;

(7) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78;

(8) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO:78;

(9) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y un polipéptido F1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80;

(10) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y un polipéptido F1
5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80;

(11) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:315 y un polipéptido F1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:316;

(12) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:315 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
15 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:316;

(13) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:317 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318;

20 (14) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:317 y un polipéptido F1

que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318;

(15) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
5 de aminoácidos de SEQ ID NO:319 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320;

(16) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:319 y un polipéptido F1
10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320;

(17) un polipéptido F2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:321 y un polipéptido F1 que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:322;

(18) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:321 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:322;

(19) un polipéptido F2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:323 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:324;

(20) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:323 y un polipéptido F1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:324.

(21) un polipéptido F2 que comprende la secuencia
10 de aminoácidos de SEQ ID NO:325 y un polipéptido F1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326; y

(22) un polipéptido F2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:325 y un polipéptido F1
15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326.

En algunas modalidades, una composición, tal como una composición farmacéutica o una vacuna, comprende dos o
20 más mutantes F de RSV diferentes. Los dos o más mutantes F de RSV diferentes pueden comprender las mismas mutaciones de aminoácidos introducidas pero comprenden un polipéptido F1 y

polipéptido F2 de cepas o subtipos de RSV diferentes. Los dos o más mutantes F de RSV diferentes pueden comprender diferentes mutaciones de aminoácidos introducidas.

En algunas modalidades, la composición comprende
5 dos mutantes diferentes que comprenden las mismas mutaciones de aminoácidos introducidas, en donde uno de los mutantes comprende un polipéptido F1 y polipéptido F2 del subtipo A de RSV y en donde el otro mutante comprende un polipéptido F1 y polipéptido F2 del subtipo B de RSV. En algunas modalidades
10 específicas, los dos mutantes diferentes comprenden la misma combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

(1) una combinación de sustituciones de aminoácidos 103C, 148C, 190I, y 486S;

15 (2) una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 55C, 188C, y 486S;

(3) una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 103C, 148C, 190I, 296I, y 486S;

(4) una combinación de sustituciones de aminoácidos
20 54H, 55C, 142C, 188C, 296I, y 371C;

(5) una combinación de sustituciones de aminoácidos 55C, 188C, y 486S;

(6) una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 55C, 188C, y 190I;

(7) una combinación de sustituciones de aminoácidos 55C, 188C, 190I, y 486S;

5 (8) una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 55C, 188C, 190I, y 486S;

(9) una combinación de sustituciones de aminoácidos 155C, 190I, 290C, y 486S;

(10) una combinación de sustituciones de
10 aminoácidos 54H, 55C, 142C, 188C, 296I, 371C, 486S, 487Q, y 489S; y

(11) una combinación de sustituciones de aminoácidos 54H, 155C, 190I, 290C, y 296I.

Además del componente inmunogénico, la vacuna
15 además puede comprender cualquiera de un agente inmunomodulador, tal como un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio; composiciones de emulsión en aceite (o composiciones de agua en aceite),
20 que incluyen emulsiones de agua en escualeno tales como MF59 (véase por ejemplo, WO 90/14837); formulaciones de saponina, tales como por ejemplo, QS21 y Complejos Inmunoestimulantes

(ISCOMS) (véase por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); derivados bacterianos o microbianos, ejemplos de los cuales son el monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-
5 desacilado (3dMPL), motivo de CpG que contiene oligonucleótidos, toxinas bacterianas que ribosilan ADP o mutantes de las mismas, tales como la enterotoxina LT lábil por calor de *E. coli*, toxina CT de cólera, y similares. También es posible utilizar un adyuvante codificado por
10 vector, por ejemplo, al utilizar ácidos nucleicos heterólogos que codifican una fusión del dominio de oligomerización de la proteína de unión a C4 (C4 pb) en el antígeno de interés (por ejemplo, Solabomi et al., 2008, Infect Immun 76: 3817-23). En ciertas modalidades, las composiciones de los mismos
15 comprenden aluminio como un adyuvante, por ejemplo, en forma de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato potásico de aluminio, o combinaciones de los mismos, en concentraciones de 0.05-5 mg, por ejemplo, de 0.075-1.0 mg de contenido de aluminio por dosis.

20

E. USOS DE LOS MUTANTES DE PROTEÍNA F DE RSV,
MOLÉCULAS Y COMPOSICIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La presente descripción también se relaciona con el uso de un mutante de proteína F de RSV, ácidos nucleicos que codifican un mutante de proteína F de RSV, o vectores para expresar un mutante de proteína F de RSV, o composiciones que
5 comprenden un mutante o ácidos nucleicos de la proteína F de RSV.

En diversas modalidades, la presente descripción proporciona un método para obtener una respuesta inmune a RSV en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una
10 cantidad efectiva de un mutante de proteína F de RSV, una molécula de ácidos nucleicos que codifica un mutante de proteína F de RSV, o una composición que comprende un mutante o molécula de ácidos nucleicos de la proteína F de RSV.

En algunas modalidades particulares, la presente
15 descripción proporciona un método para prevenir la infección de RSV en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición farmacéutica, tal como una vacuna que comprende un mutante de proteína F de RSV, un ácido nucleico que codifica un mutante de proteína F de RSV,
20 o un vector que exprese un mutante de proteína F de RSV. En algunas modalidades, el sujeto es un humano. En algunas modalidades particulares, el humano es un niño, tal como un

infante. En algunas otras modalidades particulares, el humano es mujer, en particular una mujer embarazada.

La composición puede administrarse al sujeto con o sin la administración de un adyuvante. La cantidad efectiva
5 administrada al sujeto es una cantidad que sea suficiente para obtener una respuesta inmune contra un antígeno de RSV, tal como una proteína F de RSV, en el sujeto. Los sujetos que pueden seleccionarse para tratamiento incluyen aquellos que se encuentran en riesgo de desarrollar una infección de RSV
10 debido a la exposición o la posibilidad de exponerse a RSV. Debido a que casi todos los humanos se infectan con RSV durante la edad de 2 años, toda la cohorte de nacimiento se incluye como una población relevante para su inmunización. Esto podría hacerse, por ejemplo, al comenzar con un régimen
15 de inmunización en cualquier momento a partir del nacimiento a los 6 meses de edad, de los 6 meses de edad a los 5 años de edad, en mujeres embarazadas (o mujeres en edad fértil) para proteger a sus hijos de la transferencia pasiva del anticuerpo, miembros de familia con bebés recién nacidos o
20 aquellos aún en el útero, y sujetos mayores de 50 años de edad. Los sujetos en mayor riesgo de infección de RSV con síntomas severos (por ejemplo, que requieran de

hospitalización) incluyen niños prematuros, con displasia broncopulmonar, y con enfermedad cardíaca congénita.

La administración de las composiciones provistas por la presente descripción, tales como composiciones
5 farmacéuticas, puede llevarse a cabo utilizando vías de administración estándar. Modalidades no limitantes incluyen una administración parenteral, tal como la administración intradérmica, intramuscular, subcutánea, transcutánea, mucosal, u oral.

10 La dosis total de la composición provista a un sujeto durante una administración puede variar como se conoce por el profesional experimentado.

También es posible proporcionar una o más administraciones de refuerzo en una o más de las
15 composiciones de vacuna. Si se realiza una vacunación de refuerzo, típicamente, tal vacunación de refuerzo se administrará al mismo sujeto en un momento entre una semana y 10 años, de preferencia entre dos semanas y seis meses, después de administrar la composición al sujeto por primera
20 vez (la cual en tales casos se denomina como "vacunación de inicio"). En regímenes alternativos de refuerzo, también es posible administrar vectores diferentes, por ejemplo, uno o

más adenovirus, u otros vectores tales como la vacuna de virus o ADN, o proteína de Ankara (MVA) modificado, al sujeto después de la vacunación inicial. Es decir, por ejemplo, es posible administrar al sujeto un vector viral recombinante del mismo un inicio, y reforzar con una composición que comprende la proteína F de RSV.

En ciertas modalidades, la administración comprende una administración de inicio y al menos una administración de refuerzo. En otras ciertas modalidades, la administración se proporciona anualmente. Incluso en otras modalidades, la administración se proporciona anualmente junto con una vacuna contra influenza.

Las vacunas provistas por la presente descripción pueden utilizarse junto con una o más vacunas diferentes. Por ejemplo, en adultos pueden utilizarse junto con una vacuna contra influenza, vacua contra neumococo (Prennar), vacuna contra tétanos, vacuna contra difteria, y vacuna contra tos ferina. Para uso pediátrico, las vacunas provistas por la presente descripción pueden utilizarse con cualquier otra vacuna indicada para pacientes pediátricos.

Tabla 17. Residuos de aminoácidos no consensados entre las secuencias de proteína F a partir de las cepas A de RSV seleccionadas...

Posición de aminoácido	Nombre de la cepa (GenBank)								
	A2 (138251)	RSVA/Homo sapiens/USA/L A2_21/2013 (AHX57185)	A/WI/629-4071/98 (AEQ63520)	TX-79223 (AGG39418)	BE08-5146 (AFM55563)	Tracy (AGG39397)	RSV-4 (AEO45850)	06-000827 (AFM55442)	RSVA/Homo sapiens/USA/90I-226A-01/1990 (AHY21463)
4	L	P	P	P	P	P	P	P	P
6	L	L	L	L	L	I	L	L	L
8	A	T	T	T	T	A	T	T	T
15	L	L	L	L	L	L	L	F	F
16	T	A	A	A	A	I	T	A	A
20	F	L	L	L	L	F	F	L	L
25	G	S	S	S	S	S	S	S	S
59	I	I	I	I	I	I	I	I	V
101	P	P	P	P	Q	T	P	P	P
102	P	A	A	A	A	A	A	A	A
103	T	A	A	A	A	A	A	A	A
105	N	S	N	N	S	N	N	N	N
122	A	T	T	T	T	A	T	T	T
124	K	N	N	T	N	K	N	N	N
125	T	T	T	T	T	T	N	N	T
129	L	L	V	L	L	L	L	L	L
152	V	I	I	I	I	I	I	I	I
276	N	S	N	N	N	N	N	N	N
356	E	E	E	E	E	D	E	E	E
379	I	V	V	V	V	V	V	V	V
384	V	I	I	T	I	I	V	I	I
447	M	V	V	V	V	V	V	V	V
518	A	A	A	A	A	A	V	V	A
540	S	A	S	S	S	S	L	L	S
547	L	L	L	L	L	L	L	F	L
562	D	D	D	D	D	D	D	E	D
574	N	N	N	S	N	N	N	N	N

5

10

15

20

5

10

15

20

Tabla 18. Residuos de aminoácidos no consensados entre las secuencias de proteína F a partir de las cepas B de RSV seleccionadas

Posición de aminoácido	18537 (138250)	Nombre de la cepa (GenBank)						
		RSVB/Homo sapiens/PER/FPP00592/2011 (AHV80758)	NH1144 (AFD34260)	TX-79247 (AGG39514)	CH-18537 (AGG39487)	NH1125 (AFI25251)	TX-79222 (AGG39523)	TX-60567 (AGG39502)
5	I	I	I	I	I	I	I	V
9	S	S	S	S	S	S	I	S
17	V	I	I	I	V	I	I	I
45	F	F	F	L	F	F	F	F
65	K	K	K	K	K	K	T	K
102	A	A	A	V	A	A	A	A
123	K	K	K	K	K	K	K	N
152	I	I	I	I	M	I	I	I
185	V	V	V	V	I	V	V	V
202	R	Q	Q	Q	R	Q	Q	Q
209	Q	Q	K	Q	Q	Q	Q	Q
226	M	K	K	K	K	K	K	K
234	T	T	T	T	T	T	T	A
292	I	I	I	I	I	M	I	I
326	I	I	I	T	I	I	I	I
371	N	N	N	Y	N	N	N	N
402	I	I	V	I	I	I	I	I
518	T	T	T	T	T	T	V	T
529	T	A	A	A	T	V	A	A

Tabla 19. Variantes del Mutante pXCS847 que comprende las Mutaciones Introducidas T103C, I148C, S190I, y D486S

ID del Mutante	Polipéptido F2		Polipéptido F1	
	SEQ ID	Secuencia de Aminoácidos (residuos 26-109)	SEQ ID	Secuencia de Aminoácidos (residuos 137-513)
pXCS847	41	QNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKENKCGTDAK VKLIKQELDKYKNAV ELQLLMQSTPACNNRA RR	42	FLGFLLVGSACASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKA VVSLSNGVSVLT/KVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETV IEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVYVQLPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTRDRGWYCDNA GSVSFFPQAEETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IHKTFSGCDYVSNKGMVDTVSVGNLTLYVYNKQEGKSLYVK GEPIINFYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLEL
847-138251 (A2)	43	QNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKENKCGTDAK VKLIKQELDKYKNAV ELQLLMQSTPACNNRA RR	44	FLGFLLVGSACASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKA VVSLSNGVSVLT/KVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETV IEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVYVQLPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTRDRGWYCDNA GSVSFFPQAEETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IHKTFSGCDYVSNKGMVDTVSVGNLTLYVYNKQEGKSLYVK GEPIINFYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLEL
847-57185 (A) (Ontario)	45	QNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKENKCGTDAK VKLIKQELDKYKNAV ELQLLMQSTPACNNRA RR	46	FLGFLLVGSACASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKA VVSLSNGVSVLT/KVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETV IEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVYVQLPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTRDRGWYCDNA GSVSFFPQAEETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IHKTFSGCDYVSNKGMVDTVSVGNLTLYVYNKQEGKSLYVK GEPIINFYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDLEL

5

10

15

20

				KTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGE PIINFYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
847-138250 (B)	47	QNITEEFYQSTCSAVSR GYFSALRTGWYTSVITI ELSNIKETKCGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPACNNRAR R	48	FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLSTNKA VV'SLSNGVSVLT/KVLDLKNYNNRLLPIVNNQQSCRSNIETV IEFQOMNSRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVYVQLPI YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNA GSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFN SKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGNLYVKG EPIINYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
847-80758 (B) (Buenos Aires)	49	QNITEEFYQSTCSAVSR GYFSALRTGWYTSVITI ELSNIKETKCGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPACNNRAR R	50	FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLSTNKA VV'SLSNGVSVLT/KVLDLKNYNNRLLPIVNNQQSCRSNIETV IEFQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVYVQLPI YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNA GSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFN SKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGNLYVKG EPIINYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
847-AFM55442 (A)	279	QNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKENKCGTDAK VKLIKQELDKYKNAVT ELQLLMQSTPACNNRA RR	280	FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTNKA VV'SLSNGVSVLT/KVLDLKNYIDKQLLPVNNKQSCRSNIETV IEFQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVYVQLPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNA GSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK GEPIINFYDPLVFPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL

20 15 10 5

847-AFM95376 (A)	281	QNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKENKCNGTDAK VKLIKQELDKYKNAVT ELQLLMQSTPACNNRA RR	282	FLGFLLVGSACASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKA VVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETV IEFQQNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNA GVSFFPQAEVCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVNVKQEGKSLEYVK GEPIIFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
847-AEQ63520 (A)	283	QNITEEFYQSTCSAVSK GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKENKCNGTDAK VKLIKQELDKYKNAVT ELQLLMQSTPACNNRA RR	284	FLGFLLVGSACASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKA VVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETV IEFQQNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNA GVSFFPQAEVCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVNVKQEGKSLEYVK GEPIIFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
847-AFD34260 (B)	285	QNITEEFYQSTCSAVSR GYFSALRTGWYTSVITI ELSNIKETKCNGTDTKV KLKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPACNNRAR R	286	FLGFLLVGSACASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTNKA VVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYINNQLLPVNVKQSCRISNIETV IEFQQNSRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPI YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNA GVSFFPQADTKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFN SKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG IIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVNVKLEGKNLEYVK GEPIIYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
847-BAE96918 (B)	287	QNITEEFYQSTCSAVSR GYFSALRTGWYTSVITI ELSNIKETKCNGTDTKV	288	FLGFLLVGSACASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTNKA VVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYINNQLLPVNVKQSCRISNIETV IEFQQNSRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLIND

20 15 10 5

			KLKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPACNNRARR		MPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYMSIMKEEVLAYVVQLPI YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGSGNICLTRDRGWYCDNA GSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFN SKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVS VGNTLYYVKNLEGKNLYVKG EPIINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFRRSDELL
847-AFD34265 (B)	289	290	QNITEEFYQSTCSAVSR GYLSALRTGWYTSVITI ELSNIKETKCNGTDTKV KLKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPACNNRARR		FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKKNALLSTNKA VVSLNMGVSVLTIKVLDLKNYNNQLLPIVNNQQSCRISNIETV IEFQKNRSLLEIAREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLIND MPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYMSIMKEEVLAYVVQLPI YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGSGNICLTRDRGWYCDNA GSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFN SKYDCKIMTSKTDISSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVS VGNTLYYVKNLEGKNLYVKG EPIINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFRRSDELL

Tabla 20. Variante del Mutante pXCS851 Que comprende las Mutaciones Introducidas T54H, T103C, I148C, S190I, V296I, D486S

ID del Mutante	Polipéptido F2		Polipéptido F1	
	SEQ ID	Secuencia de Aminoácido (residuos 26-109)	SEQ ID	Secuencia de Aminoácido (residuos 137-513)
pXCS851	51	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKCNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	52	FLGFLLGVSACASGVAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLNMGVSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVNNKQSC SISNIETVIEFQKNRRLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYMSI IKEELAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGVSFFPQAECKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSS VITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSN KGVDTVS VGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPL

5

10

15

20

GI-138251 (A2)	53	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHSHVITIEL SNIKENKCNCGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPPCNRARR	54	VFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL FLGFLLGVSACASGVAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVNNKQSC SISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEELAYVVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEINLCNVDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGGTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GMDTVSVGNTLYYVNNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
GI-57185 (A) (Ontario)	55	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHSHVITIEL SNIKENKCNCGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNSRARR	56	FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVNNKQSC SISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI KEELAYVVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNLNIDFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGGTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVNNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLV PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
GI-138250 (B)	57	QNITEEFYQSTCSAVSRG YFSALRTGWYHSHVITIEL SNIKETKCNCGTDTKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQNTPACNNRARR	58	FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYINNRLLPVNNKQSC RISNIETVIEFQQMNSRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI KEELAYVVQPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS ICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFC TMNSLTLPSEVSLCNTDFNSKYDCKIMTSKTDISSVIT SLGAIVSCYGGTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK VDTVSVGNTLYYVNNKLEGNLYVKGEPIINFYDPLVFP SSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
GI-80758 (B) (Buenos Aires)	59	QNITEEFYQSTCSAVSRG YFSALRTGWYHSHVITIEL SNIKETKCNCGTDTKVCLI	60	FLGFLLGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLSNGVSVLTIKVLDLKNYINNRLLPVNNKQSC RISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML

20 15 10 5

851-AFM55442 (A)	291	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	KQELDKYKNAVTELQLL MQNTPACNNRARR	TNSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEILAYVVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGSN ICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCD TMNSLTLPSEVSLCNTDFNSKYDCKIMTSKTDISSVIT SLGAIVSCYGGTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNKG VDTVSVGNTLYYVVKLEGNLYVKGEPINYYDPLVFP SSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
851-AFM95376 (A)	293	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	FLGFLLVGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLNNGSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVKNKQSC SISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI KEEILAYVVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGGTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVFP PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
851-AEQ63520 (A)	295	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	FLGFLLVGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLNNGSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVKNKQSC SISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI KEEILAYVVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGGTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPINIFYDPLVFP PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
	296	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	QNITEEFYQSTCSAVSKG YLSALRTGWYHVSITIEL SNIKENKNGTDAKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQSTPACNNRARR	FLGFLLVGVSACASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAVVSLNNGSVLTIKVLDLKNYIDKQLLPVKNKQSC SISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYML TNSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI KEEILAYVVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV

5

10

15

20

851-AFD34260 (B)	297	QNITEEFYQSTCSAVSRG YFSALRTGWYHSHVITIEL SNIKETKCNNGTDTKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQNTPACNNRARR	298	ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNK GVDTVSVGNLTLYVVKQEGKSLYVKGEPINFYDPLVF PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL FLGFLLGVSACASGLAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLST NKA VVSLSNGVSVLTITKVLDLKNYNNQLLPVNNQSC RISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII KEEILAYV VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGSN ICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTKVQSNRVFCD TMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDVSSVI TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNK GVDTVSVGNLTLYVVKLEGKNLVYVKGEPINYYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
851-BAE96918 (B)	299	QNITEEFYQSTCSAVSRG YFSALRTGWYHSHVITIEL SNIKETKCNNGTDTKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQNTPACNNRARR	300	FLGFLLGVSACASGLAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLST NKA VVSLSNGVSVLTITKVLDLKNYNNQLLPVNNQSC RISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII MKEEILAYV VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVI TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNK GVDTVSVGNLTLYVVKLEGKNLVYVKGEPINYYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
851-AFD34265 (B)	301	QNITEEFYQSTCSAVSRG YFSALRTGWYHSHVITIEL SNIKETKCNNGTDTKVCLI KQELDKYKNAVTELQLL MQNTPACNNRARR	302	FLGFLLGVSACASGLAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLST NKA VVSLSNGVSVLTITKVLDLKNYNNQLLPVNNQSC RISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTPLSTYML TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII KEEILAYV VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGSN ICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTKVQSNRVFCD TMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVI SLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNK VDTVSVGNLTLYVVKLEGKNLVYVKGEPINYYDPLVFP SSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL

Tabla 21. Variante de los Mutantes pXCS852 que comprenden las Mutaciones introducidas T54H, S55C, L188C, D486S

ID del Mutante	Polipéptido F2		Polipéptido F1	
	SEQ ID	Secuencia de Aminoácido (residuos 26-109)	SEQ ID	Secuencia de Aminoácido (residuos 137-513)
pXCS852	61	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCGTDAKVKLKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPATNNRARR	62	FLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNVKIKSALLS TNKAVVSLNNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK QSCSINIEVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVVS TYMLTNSSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS YSIMSIKEEVLA YVVQPL YGVIDTPCWKLHTSPLCT TNTKEGSNICTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAEETCK VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKI MTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIHK TFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVNVKQEGKSLY VKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR KSDELL
GI-138251 (A2)	63	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCGTDAKVKLKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPPTNNRARR	64	FLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNVKIKSALLS TNKAVVSLNNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK QSCSINIEVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVVS TYMLTNSSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS YSIMSIKEEVLA YVVQPL YGVIDTPCWKLHTSPLCT TNTKEGSNICTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAEETCK VQSNRVFCDTMNSLTLPSEINL CNVDIFNPKYDCKIM TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIHK FSNGCDYVSNKGMDTVSVGNTRYVNVKQEGKSLYV KGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKS DELL
GI-57185 (A) (Ontario)	65	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCGTDAKVKLKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPAANSRARR	66	FLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNVKIKSALLST NKAVVSLNNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQ SCSINIEVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVST YMLTNSSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY SIMSIKEEVLA YVVQPL YGVIDTPCWKLHTSPLCTT NTKEGSNICTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAEETCKV QSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKIMT

5

10

15

20

				SKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVYNKQEGKSLYVK GEPINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD ELL
GI-138250 (B)	67	QNIITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNNGTDTKVLIKQE LDKYKNAVTELQLLMQN TPAANNRARR	68	FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLST NKAUVSLNSGVSVCTSKVLDLKNYINNRLPIVNNQQS CRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTY MLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYS IMSHKEEVLA YVVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTNI KEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQS NRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDFNSKYDCKIMTSK TDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSG CDYVSNKGVDTVSVGNTRYVYNKLEGGKNLYVKGEP IINYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL L
GI-80758 (B) (Buenos Aires)	69	QNIITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNNGTDTKVLIKQE LDKYKNAVTELQLLMQN TPAANNRARR	70	FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLST NKAUVSLNSGVSVCTSKVLDLKNYINNRLPIVNNQ SCRISNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLST YMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSY SIMSHKEEVLA YVVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTT NIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDFNSKYDCKIMT SKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNS NGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVYNKLEGGKNLYVKG EPIINYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDE LL
852-AFM5442 (A)	303	QNIITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNNGTDAKVLIKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPAANNRARR	304	FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLST NKAUVSLNSGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLPIVNNKQ SCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVST YMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQS YSIMSHKEEVLA YVVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCT TNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAECK VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIM

5

10

15

20

852-AFM95376 (A)	305	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCGTDAKVKLIKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPAANNRARR		TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKT FSNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVVKQEGKSLYV KGEPINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKS DELL
	306			FLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNKISALLST NKAUVSLNGSVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNKQ SCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVST YMLTNSSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS YSIMSIKEEVLA YVVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPLCT TNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECK VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIM TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKT FSNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVVKQEGKSLYV KGEPINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKS DELL
852-AEQ63520 (A)	307	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCGTDAKVKLIKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPAANNRARR	308	FLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNKISALLST NKAUVSLNGSVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNKQ SCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVST YMLTNSSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS YSIMSIKEEVLA YVVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPLCT TNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECK VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIM TSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKT FSNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYYVVKQEGKSLYV KGEPINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKS DELL
852-AFD34260 (B)	309	QNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCGTDTKVKLIKQE LDKYKNAVTELQLLMQN TPAANNRARR	310	FLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNKINALLST NKAUVSLNGSVSVCTSKVLDLKNYINNQLLPVKNKQ SCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVST YMLTNSSELLSLNDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSY SIMSIKEEVLA YVVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPLCTT NIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMT SKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF

5

10

15

20

852-BAE96918 (B)	311	QNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNGTDTKVKLIKQE LDKYKNAVTELOQLLMQN TPAANNRR	312	SNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYVVKLEGKNLYVK GEPIINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRS DELL FLGFLLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVNNKKNALLST NKAVVSLNNGSVCTSKVLDLKNYINQLLPIVNNQQ SCRISNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLST YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSY SIMSIMKEEVLAYVYVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTT NIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNDIFNSKYDCKIMT SKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFS NGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYVVKLEGKNLYVK EPIINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDE LL
852-AFD34265 (B)	313	QNITEEFYQSTCSAVSRGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNGTDTKVKLIKQE LDKYKNAVTELOQLLMQN TPAANNRR	314	FLGFLLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVNNKKNALLST NKAVVSLNNGSVCTSKVLDLKNYINQLLPIVNNQQ SCRISNIETVIEFQQKNSRLLEIAREFSVNAGVTTPLST YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSY SIMSIKEEVLAYVYVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTT NIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNDIFNSKYDCKIMT SKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFS NGCDYVSNKGVDTVSVGNLTLYVVKLEGKNLYVK EPIINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDE LL

Tabla 22. Variante del Mutante pXCS855 que comprende las Mutaciones Introducidas T54H, S55C, L188C, S190I, D486S

ID del Mutante	Polipéptido F2		Polipéptido F1	
	SEQ ID	Secuencia de Aminoácido (residuos 26-109)	SEQ ID	Secuencia de Aminoácido (residuos 137-513)
pXCS855	71	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNGTDAKVKLIKQ ELDKYKNAVTEQLQLLMQS TPATNNRARR	72	FLGFLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEV NKKIKSALLST NKA VVSLSNGSVCTIKVLDL KNYIDKQLLPV NKQSC SISNIETVIEFQ QKNNRLL LEITREFSVNAGV TTPVSTYML TNSELLSLIND MPITNDQK KLMSSNVQIVR QQSYSIMSI IKEEVLAYV VQPLYGVID TPCWKLHTS PLCTTNTKEG SNICLRTDR GWYCDNAGS VSFFPQAE TCKVQSNRVF CDTMNSLTL PSEVNL CNVDIFNPKY DCKIMTSKTD VSS SVITSLGAIV SCYGKTKCT ASNKNRGI KTFSGCDYVS NKGVDTVS VGNTLYYV NKKQEGKSLY VKGEPIINFYD PL LVFSSFEF DASISQVNE KINQSLAFIR KSDELL
855-GI138251 (A2)	73	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNGTDAKVKLIKQ ELDKYKNAVTEQLQLLMQS TPPTNNRARR	74	FLGFLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEV NKKIKSALLST NKA VVSLSNGSVCTIKVLDL KNYIDKQLLPV NKQSC SISNIETVIEFQ QKNNRLL LEITREFSVNAGV TTPVSTYML TNSELLSLIND MPITNDQK KLMSSNVQIVR QQSYSIMSI IKEEVLAYV VQPLYGVID TPCWKLHTS PLCTTNTKEG SNICLRTDR GWYCDNAGS VSFFPQAE TCKVQSNRVF CDTMNSLTL PSEINLCN VDIFNPKYD CKIMTSKTD VSSS VITSLGAIV SCYGKTKCT ASNKNRGI KTFSGCDYVS NKGMDTVS VGNTLYYV NKKQEGKSLY VKGEPIINFYD PL VFPSSFEF DASISQVNE KINQSLAFIR KSDELL
855-GI57185 (A) (Ontario)	75	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNGTDAKVKLIKQ ELDKYKNAVTEQLQLLMQS TPAANSRARR	76	FLGFLLGVGSAIASGVA VSKVLHLEGEV NKKIKSALLSTN KAVVSLSNGSVCTIKVLDL KNYIDKQLLPV NKQSCSI SNIETVIEFQ QKNNRLL LEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLIND MPITNDQK KLMSSNVQIVR QQSYSIMSII KEEVLAYV VQPLYGVID TPCWKLHTS PLCTTNTKEGS NICLRTDR GWYCDNAGS VSFFPQAE TCKVQSNRVFC DTMNSLTL PSEVNL CNVDIFNPKY DCKIMTSKTD VSSSV ITSLSGAIV SCYGKTKCT ASNKNRGI KTFSGCDYVS NKGVDTVS VGNTLYYV NKKQEGKSLY VKGEPIINFYD PLVF

20 15 10 5

855-GI138250 (B)	77	QNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNCGTDTKVVKLIKQE LDKYKNAVTEQLQLLMQN TPAANNRARR	78	PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLSTN KAVVSLNSGVSVCTIKVLDLKNYNNRLLPIVNNQSCSR ISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVI TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVVKLEGNLYVKGEPIINYYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
855-GI80758 (B) (Buenos Aires)	79	QNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNCGTDTKVVKLIKQE LDKYKNAVTEQLQLLMQN TPAANNRARR	80	FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLSTN KAVVSLNSGVSVCTIKVLDLKNYNNRLLPIVNNQSCSR ISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVI TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVVKLEGNLYVKGEPIINYYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
855-AFM55442 (A)	315	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNCGTDAKVVKLIKQ ELDKYKNAVTEQLQLLMQS TPAANNRARR	316	FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTN KAVVSLNSGVSVCTIKVLDLKNYIDKQLLPIVNNQSCSI SNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSVSLCNTDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
855-AFM95376 (A)	317	QNITEEFYQSTCSAVSKGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNCGTDAKVVKLIKQ	318	FLGFLLGVSALASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKSALLSTN KAVVSLNSGVSVCTIKVLDLKNYIDKQLLPIVNNQSCSI SNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLT

5

10

15

20

			ELDKYKNAVTELQLLMQS TPAANNRARR			NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPLYGVDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNL CNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
855-AEQ63520 (A)	319	320	QNITEEFYQSTCSAVSRGY LSALRTGWYHCVITIELSN IKENKCNAGTDKVKLIKQ ELDKYKNAVTELQLLMQS TPAANNRARR			FLGFLLGVSAGIASGIAVSKVLHLEGEVNNKIKSALLSTN KAVVSLNNGSVCTIKVLDLKNYIDKQLLPVNNKQSCSI SNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPLYGVDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQAECKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNL CNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTRYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF PSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
855-AFD34260 (B)	321	322	QNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNAGTDKVKLIKQE LDBKYKNAVTELQLLMQN TPAANNRARR			FLGFLLGVSAGIASGIAVSKVLHLEGEVNNKIKSALLSTN KAVVSLNNGSVCTIKVLDLKNYINNQLLPVNNKQSCR ISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPIYGVDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQADTKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDVSSSV ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTRYVVKLEGNLYVKGEPIINYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
855-BAE96918 (B)	323	324	QNITEEFYQSTCSAVSRGY FSALRTGWYHCVITIELSN IKETKCNAGTDKVKLIKQE LDBKYKNAVTELQLLMQN TPAANNRARR			FLGFLLGVSAGIASGIAVSKVLHLEGEVNNKIKSALLSTN KAVVSLNNGSVCTIKVLDLKNYINNQLLPVNNKQSCR ISNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVQLPIYGVDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVFFPQADTKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSVI

5

10

15

20

855-AFD34265 (B)	325	QNITEFYQSTCSAVSRGY LSALRTGWYHCVTIELSN IKETKCNQGTDTKVKKLQOE LDKYKNAVTELQLLMQN TPAANNRARR	326	TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVKNKLEGNLYVKGEPIINYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL FLGFLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTN KAVVSLSNGVSVCTIKVLDLKNYINNQLLPVNNQSSCR ISNIETVIEFQQKNSRLLLEIAREFSVNAGVTTPLSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII KEEVLAYVVOQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGS NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVSLCNTDFNSKYDCKIMTSKTDISSVI TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVSNK GVDTVSVGNTLYYVKNKLEGNLYVKGEPIINYDPLV FPSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL
---------------------	-----	---	-----	--

Tabla 23 .Índice de Secuencias

SEQ ID NO	Descripción
1, 4, 81-210	Secuencia de Aminoácidos del polipéptido precursor F0 del subtipo A de RSV representativo
2, 6, 211-263	Secuencia de Aminoácidos del polipéptido precursor F0 del subtipo B de RSV representativo
264-270	Secuencia de Aminoácidos del polipéptido precursor F0 de RSV de bovino representativo
3	Secuencia de aminoácidos del ectodominio (con plegado) de A2 de RSV
5	Secuencia de aminoácidos del ectodominio (con plegado) de A de RSV (Ontario)
7	Secuencia de aminoácidos del ectodominio (con plegado) de una cepa B de RSV
8-18	Secuencia de nucleótidos del polipéptido precursor de los mutantes F de RSV representativos
19-21, 32-39, 271-278	Secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor F de mutantes F de RSV representativos
22-31	Secuencias de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera y de dominio variable de cadena pesada de anticuerpos F de RSV
40	Secuencia de aminoácidos plegada de fibritina T4
41-80, 279-326	Secuencia de aminoácidos del polipéptido F2 y polipéptido F1 de mutantes F de RSV representativos

F. EJEMPLOS

La invención se describe aún más por los siguientes ejemplos ilustrativos. De ninguna manera los ejemplos no limitan la invención. Únicamente sirven para aclarar la invención.

Ejemplo 1: Diseño y Preparación de Mutantes de Proteína F de RSV

1A: Mutantes F de RSV con Dominio Plegado

Este ejemplo ilustra el diseño y preparación de diversos mutantes de proteína F de RSV, que incluyen un plegado dominio de trimerización de fibritina y mutaciones de aminoácidos introducidas, tales como mutaciones de enlace disulfuro diseñadas, mutaciones de carga de cavidad, mutaciones electrostáticas, o una combinación de las mismas. Cada uno de los mutantes F de RSV ejemplares que se identifica por un identificador único, tal como pXCS501, pXCS601, etc., se proporciona en las Tablas 1-6. Cada uno de estos mutantes se diseñó y preparó en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:3, la cual también se ilustra en la Figura 1. Los residuos de aminoácidos 1-513 de la secuencia de SEQ ID NO:3 son idénticos a los residuos de

aminoácidos 1-513 del polipéptido precursor F0 de A2 de RSV
nativo como se establece en SEQ ID NO:1, excepto para las
tres sustituciones de origen natural, P102A, I379V y M447V,
en la secuencia de SEQ ID NO:3. Por lo tanto, las secuencias
5 de aminoácidos de estos mutantes F ejemplares son idénticas,
excepto para las mutaciones de aminoácidos introducidas como
se observa para cada mutante listado en las Tablas 1-6. Cada
uno de estos mutantes de proteína F de RSV comprende dos
cadenas de polipéptidos separadas. Una de las cadenas de
10 polipéptidos, el polipéptido F2, comprende los aminoácidos
26-109 de SEQ ID NO:3 excepto para las mutaciones
introducidas como se observa. La otra cadena de polipéptidos
comprende el polipéptido F1 (residuos 137-513) enlazado a un
dominio plegado de trimerización (residuos 518-544) mediante
15 un enlazador SAIG (residuos 514-517). El péptido de señal
(residuos 1-25) y pep27 (residuos 110-136) de SEQ ID NO:3 se
escindieron desde el precursor F0 durante el proceso de
expresión. El proceso para la expresión y purificación de
estos mutantes F de RSV ejemplares se describe en los
20 Ejemplos 2 y 3.

1B: Mutantes F de RSV sin Dominio Plegado

El mutante F de RSV, pXCS899, que estaba desprovisto del dominio plegado, se preparó con el mismo método descrito en el Ejemplo 1A anterior, excepto que se

5 suprimieron los aminoácidos 514-544 de la secuencia precursora F0 de SEQ ID NO:3. La secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor de pXCS899 se estableció en SEQ ID NO:271.

10 Tabla 1. Mutantes de proteína F de RSV Ejemplares que comprenden la Mutación de Disulfuro Diseñada

	ID del Mutante	Mutaciones
	pXCS501	I28C, G464C
	pXCS502	E30C, S466C
15	pXCS503	Q34C, G471C
	pXCS504	S35C, G471C
	pXCS505	W52C, S150C
	pXCS506	T54C, G151C
	pXCS507	S55C, L188C
	pXCS508	V56C, V187C
20	pXCS509	V56C, T189C

5	pXCS510	I57C, S190C
	pXCS511	T58C, K191C
	pXCS512	I59C, L193C
	pXCS513	E60C, K196C
	pXCS514	L61C, L195C
10	pXCS515	S62C, K196C
	pXCS516	S62C, I199C
	pXCS518	T103C, A147C
	pXCS519	T103C, I148C
	pXCS520	R106C, V144C
15	pXCS521	L138C, T337C
	pXCS522	G139C, P353C
	pXCS523	G139C, Q354C
	pXCS524	L142C, N371C
	pXCS525	G145C, M370C
20	pXCS526	I148C, Y286C
	pXCS527	G151C, V300C
	pXCS528	G151C, Q302C
	pXCS529	V154C, V300C
	pXCS531	S155C, V300C
20	pXCS532	L158C, S290C
	pXCS534	V164C, K293C
	pXCS535	V164C, E294C

5	pXCS536	T397C, P484C
	pXCS537	T397C, E487C
	pXCS538	K399C, S485C
	pXCS539	L410C, G464C
	pXCS540	L410C, S466C
10	pXCS541	S443C, S466C
	pXCS542	L138C, P353C
	pXCS543	G151C, I288C
	pXCS544	S155C, S290C
	pXCS545	S155C, S290C; I28C, G464C
15	pXCS546	S155C, S290C; E30C, S466C
	pXCS547	S155C, S290C; Q34C, G471C
	pXCS548	S155C, S290C; S35C, G471C
	pXCS549	S155C, S290C; T397C, P484C
	pXCS550	S155C, S290C; T397C, E487C
20	pXCS551	S155C, S290C; K399C, S485C
	pXCS553	S155C, S290C; L410C, S466C
	pXCS554	S155C, S290C; S443C, S466C
	pXCS556	R106C, V144C; S443C, S466C
	pXCS557	R106C, V144C; L142C, N371C
20	pXCS558	R106C, V144C; T397C, P484C
	pXCS596	S55C, L188C; T103C, I148C
	pXCS597	S55C, L188C; R106C, V144C

5	pXCS598	S55C, L188C; L142C, N371C
	pXCS599	S55C, L188C; T397C, P484C
	pXCS600	S55C, L188C; Q34C, G471C
	pXCS601	S55C, L188C; T397C, E487C
	pXCS602	S55C, L188C; S443C, S466C
10	pXCS603	S55C, L188C; L410C, S466C
	pXCS604	S55C, L188C; S35C, G471C
	pXCS605	S55C, L188C; S62C, I199C
	pXCS606	T103C, I148C; Q34C, G471C
	pXCS607	T103C, I148C; S35C, G471C
15	pXCS608	T103C, I148C; S62C, I199C
	pXCS609	T103C, I148C; L142C, N371C
	pXCS610	T103C, I148C; T397C, P484C
	pXCS611	T103C, I148C; T397C, E487C
	pXCS612	T103C, I148C; L410C, S466C
20	pXCS613	T103C, I148C; S443C, S466C
	pXCS614	Q34C, G471C; S62C, I199C
	pXCS615	Q34C, G471C; R106C, V144C
	pXCS616	Q34C, G471C; L138C, T337C
	pXCS617	Q34C, G471C; L142C, N371C
20	pXCS618	L142C, N371C; S35C, G471C
	pXCS619	L142C, N371C; S62C, I199C
	pXCS620	L142C, N371C; S155C, S290C

5	pXCS621	L142C, N371C; T397C, P484C
	pXCS622	L142C, N371C; T397C, E487C
	pXCS623	L142C, N371C; L410C, S466C
	pXCS624	L142C, N371C; S443C, S466C
	pXCS625	R106C, V144C; S62C, I199C
10	pXCS626	R106C, V144C; T397C, E487C
	pXCS627	R106C, V144C; L410C, S466C
	pXCS628	S55C, L188C; L138C, T337C
	pXCS629	S55C, L188C; G145C, M370C
	pXCS630	T103C, I148C; L138C, T337C
15	pXCS712	S55C, L188C; R106C, V144C; L142C, N371C
	pXCS517	S62C, D200C
	pXCS530	S155C, I288C
	pXCS533	L158C, I291C
	pXCS552	S155C, S290C; L410C, G464C
	pXCS555	S155C, S290C; R106C, V144C

Tabla 2. Mutantes de la Proteína F de RSV
Ejemplares que comprenden las Mutaciones de Carga de Cavidad

	ID del Mutante	Mutaciones
	pXCS559	S55I
	pXCS560	S55Y
5	pXCS561	S62L
	pXCS562	S62Y
	pXCS563	S155H
	pXCS564	S155Y
	pXCS565	S190I
	pXCS566	S190M
10	pXCS567	S190Y
	pXCS568	S290H
	pXCS569	S290M
	pXCS570	S290Y
	pXCS571	T54H
15	pXCS572	T54I
	pXCS573	T58L
	pXCS574	T58M
	pXCS575	T189I
	pXCS577	T219I
	pXCS578	T219M
20	pXCS579	T397I
	pXCS580	T397Y
	pXCS581	G151A

5	pXCS582	G151H
	pXCS583	A147H
	pXCS584	A147I
	pXCS585	A298L
	pXCS586	A298M
10	pXCS587	V164I
	pXCS588	V187I
	pXCS589	V192H
	pXCS590	V207I
	pXCS591	V220I
15	pXCS592	V296I
	pXCS593	V300I
	pXCS594	V495Y
	pXCS595	R106W
	pXCS666	S190F, V207L
20	pXCS691	V495Y, S62L
	pXCS692	V495Y, T219M
	pXCS693	V495Y, T54H
	pXCS694	V495Y, T58L
	pXCS695	V495Y, V164I
20	pXCS696	V495Y, V187I
	pXCS697	V495Y, V296I
	pXCS698	V296I, S62L

5	pXCS699	V296I, T219M
	pXCS700	V296I, T54H
	pXCS701	T54H, S62L
	pXCS702	T54H, T219M
	pXCS711	F488W
	pXCS576	T189Y

Tabla 3. Mutantes de Proteína F de RSV Ejemplares
que comprenden las Mutaciones Electroestáticas

10	ID del Mutante	Mutaciones
	pXCS631	E82Q
15	pXCS632	E82S
	pXCS633	E82L
	pXCS634	E92D
	pXCS635	E92T
	pXCS636	E92Q
20	pXCS637	E92F
	pXCS638	R106Q
	pXCS639	R106N
	pXCS640	R106F
	pXCS641	K315F
	pXCS642	K315L

5	pXCS643	K315I
	pXCS644	K315Q
	pXCS645	R339Q
	pXCS646	R339W
	pXCS647	R339F
10	pXCS648	D392N
	pXCS649	D392S
	pXCS650	D392P
	pXCS651	K394M
	pXCS652	K394T
15	pXCS653	K394F
	pXCS654	K399R
	pXCS655	K399M
	pXCS656	K399S
	pXCS657	D486H
20	pXCS658	D486S
	pXCS659	D486T
	pXCS660	E487Q
	pXCS661	E487H
	pXCS662	E487D
20	pXCS663	D489H
	pXCS664	D489S
	pXCS665	D489N

Tabla 4. Mutantes de proteína F de RSV Ejemplares que comprenden la Mutación de Disulfuro Diseñada y Mutaciones de Carga de Cavidad

	ID del Mutante	Mutaciones
5	pXCS667	R106C-V144C; S443C-S466C; S55I
	pXCS668	R106C-V144C; L142C-N371C; S55I
	pXCS669	R106C-V144C; T397C-P484C; S55I
	pXCS670	R106C-V144C; S443C-S466C; T54H
	pXCS671	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H
	pXCS672	R106C-V144C; T397C-P484C; T54H
10	pXCS674	R106C-V144C L142C-N371C; T54H, S190Y
	pXCS679	S62C-I199C; L142C-N371C; S55I
	pXCS680	S62C-I199C; L142C-N371C; T54H
	pXCS683	Q34C-G471C; L142C-N371C; S62L
	pXCS684	Q34C-G471C; L142C-N371C; T219M
	pXCS685	Q34C-G471C; L142C-N371C; T54H
15	pXCS686	Q34C-G471C; L142C-N371C; V164I
	pXCS687	Q34C-G471C; L142C-N371C; V187I
	pXCS688	Q34C-G471C; L142C-N371C; V296I
	pXCS689	Q34C-G471C; L142C-N371C; T397Y
	pXCS690	Q34C-G471C; L142C-N371C; V495Y
	pXCS713	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H
20	pXCS714	Q34C-G471C; S155C-S290C; V296I
	pXCS715	Q34C-G471C; S155C-S290C; V495Y
	pXCS716	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, V495Y
	pXCS717	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, V296I

	pXCS718	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS719	Q34C-G471C; S155C-S290C; S190I
	pXCS720	S155C-S290C; L410C-S466C; T54H
	pXCS721	S155C-S290C; L410C-S466C; V296I
	pXCS722	S155C-S290C; L410C-S466C; V495Y
5	pXCS723	S155C-S290C; L410C-S466C; T54H, V495Y
	pXCS724	S155C-S290C; L410C-S466C; T54H, V296I
	pXCS725	S155C-S290C; L410C-S466C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS726	S155C-S290C; L410C-S466C; S190I
	pXCS727	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H
	pXCS728	R106C-V144C; L142C-N371C; V296I
10	pXCS729	R106C-V144C; L142C-N371C; V495Y
	pXCS730	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, V495Y
	pXCS731	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, V296I
	pXCS732	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS733	R106C-V144C; L142C-N371C; S190I
	pXCS734	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H
	pXCS735	S55C-L188C; L142C-N371C; V296I
15	pXCS736	S55C-L188C; L142C-N371C; V495Y
	pXCS737	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, V495Y
	pXCS738	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, V296I
	pXCS739	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS740	S55C-L188C; L142C-N371C; S190I
	pXCS741	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H
20	pXCS742	Q34C-G471C; S55C-L188C; V296I
	pXCS743	Q34C-G471C; S55C-L188C; V495Y
	pXCS744	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H, V495Y

5	pXCS745	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H, V296I
	pXCS746	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS747	Q34C-G471C; S55C-L188C; S190I
	pXCS748	T103C-I148C; T54H
	pXCS749	T103C-I148C; V296I
	pXCS750	T103C-I148C; V495Y
	pXCS751	T103C-I148C; T54H, V495Y
	pXCS752	T103C-I148C; T54H, V296I
	pXCS753	T103C-I148C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS754	T103C-I148C; S190I
10	pXCS781	S55C-L188C; T54H
	pXCS782	S55C-L188C; V296I
	pXCS783	S55C-L188C; V495Y
	pXCS784	S55C-L188C; T54H, V495Y
	pXCS785	S55C-L188C; T54H, V296I
	pXCS786	S55C-L188C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS787	S55C-L188C; S190I
15	pXCS789	R106C-V144C; T54H
	pXCS790	R106C-V144C; V296I
	pXCS791	R106C-V144C; V495Y
	pXCS792	R106C-V144C; T54H, V495Y
	pXCS793	R106C-V144C; T54H, V296I
	pXCS794	R106C-V144C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS795	R106C-V144C; S190I
20	pXCS797	L142C-N371C; T54H
	pXCS798	L142C-N371C; V296I
	pXCS799	L142C-N371C; V495Y
	pXCS800	L142C-N371C; T54H, V495Y

5	pXCS801	L142C-N371C; T54H, V296I
	pXCS802	L142C-N371C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS803	L142C-N371C; S190I
	pXCS805	S155C-S290C; T54H
	pXCS806	S155C-S290C; V296I
	pXCS807	S155C-S290C; V495Y
	pXCS808	S155C-S290C; T54H, V495Y
	pXCS809	S155C-S290C; T54H, V296I
	pXCS810	S155C-S290C; T54H, V296I, V495Y
	pXCS811	S155C-S290C; S190I
10	pXCS812	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, S190I
	pXCS815	S155C-S290C; L410C-S466C; T54H, S190I
	pXCS818	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, S190I
	pXCS821	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, S190I
	pXCS827	T103C-I148C; T54H, S190I
	pXCS828	T103C-I148C; S190I, V495Y
	pXCS830	S55C-L188C; T54H, S190I
	pXCS831	S55C-L188C; S190I, V495Y
15	pXCS833	R106C-V144C; T54H, S190I
	pXCS834	R106C-V144C; S190I, V495Y
	pXCS836	L142C-N371C; T54H, S190I
	pXCS837	L142C-N371C; S190I, V495Y
	pXCS839	S155C-S290C; T54H, S190I
	pXCS840	S155C-S290C; S190I, V495Y
20	pXCS889	T103C-I148C; S190I, V296I
	pXCS890	T103C-I148C; T54H, S190I, V296I
	pXCS891	S55C-L188C; S190I, V296I
	pXCS892	S55C-L188C; T54H, S190I, V296I

5	pXCS893	R106C-V144C; S190I, V296I
	pXCS894	R106C-V144C; T54H, S190I, V296I
	pXCS895	L142C-N371C; S190I, V296I
	pXCS896	L142C-N371C; T54H, S190I, V296I
	pXCS897	S155C-S290C; S190I, V296I
	pXCS898	S155C-S290C; T54H, S190I, V296I

Tabla 5. Mutantes de Proteína F de RSV Ejemplares que comprenden la Mutación de Disulfuro Diseñada y Mutaciones Electroestáticas.

10	ID del Mutante	Mutaciones
	pXCS755	Q34C-G471C; S155C-S290C; D486S
15	pXCS756	S155C-S290C; L410C-S466C; D486S
	pXCS757	R106C-V144C; L142C-N371C; D486S
	pXCS758	S55C-L188C; L142C-N371C; D486S
	pXCS759	Q34C-G471C; S55C-L188C; D486S
	pXCS760	T103C-I148C; D486S
	pXCS770	Q34C-G471C; S155C-S290C; D486S, E487Q
	pXCS771	Q34C-G471C; S155C-S290C; D486S, D489S
	pXCS772	Q34C-G471C; S155C-S290C; D486S, E487Q, D489S
	pXCS776	T103C-I148C; D486S, E487Q
	pXCS777	T103C-I148C; D486S, D489S
20	pXCS778	T103C-I148C; D486S, E487Q, D489S
	pXCS779	T103C-I148C; E92D
	pXCS780	S55C-L188C; D486S

5	pXCS788	R106C-V144C; D486S
	pXCS796	L142C-N371C; D486S
	pXCS804	S155C-S290C; D486S
	pXCS883	S55C-L188C; L142C-N371C; D486S, E487Q
	pXCS884	S55C-L188C; L142C-N371C; D486S, D489S
	pXCS885	S55C-L188C; L142C-N371C; D486S, E487Q, D489S

Tabla 6. Mutantes de proteína F de RSV Ejemplares que comprenden una Combinación de Mutación de Disulfuro Diseñada, Mutaciones de Carga de Cavidad, y Mutaciones Electroestáticas.

15	ID del Mutante	Mutaciones
	pXCS761	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS762	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S
	pXCS763	Q34C-G471C; S155C-S290C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS764	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS765	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S
20	pXCS766	Q34C-G471C; S55C-L188C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S, V495Y

5	pXCS767	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS768	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S
	pXCS769	R106C-V144C; L142C-N371C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS773	T103C-I148C; T54H, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS774	T103C-I148C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S
10	pXCS775	T103C-I148C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S, V495Y
	pXCS842	T103C-I148C; T54H, S190I, D486S
	pXCS843	T103C-I148C; S190I, D486S, V495Y
	pXCS844	T103C-I148C; T54H, S190I, D486S, V495Y
	pXCS845	T103C-I148C; T54H, D486S
15	pXCS846	T103C-I148C; D486S, V495Y
	pXCS847	T103C-I148C; S190I, D486S
	pXCS848	T103C-I148C; V296I, D486S
	pXCS849	T103C-I148C; T54H, V296I, D486S
	pXCS850	T103C-I148C; S190I, V296I, D486S
20	pXCS851	T103C-I148C; T54H, S190I, V296I, D486S
	pXCS852	S55C-L188C; T54H, D486S
	pXCS853	S55C-L188C; S190I, D486S
	pXCS854	S55C-L188C; V296I, D486S
	pXCS855	S55C-L188C; T54H, S190I, D486S
	pXCS856	S55C-L188C; T54H, V296I, D486S
	pXCS857	S55C-L188C; S190I, V296I, D486S

5	pXCS858	S55C-L188C; T54H, S190I, V296I, D486S
	pXCS859	R106C-V144C; T54H, D486S
	pXCS860	R106C-V144C; S190I, D486S
	pXCS861	R106C-V144C; V296I, D486S
	pXCS862	R106C-V144C; T54H, S190I, D486S
10	pXCS863	R106C-V144C; T54H, V296I, D486S
	pXCS864	R106C-V144C; S190I, V296I, D486S
	pXCS865	R106C-V144C; T54H, S190I, V296I, D486S
	pXCS866	L142C-N371C; T54H, D486S
	pXCS867	L142C-N371C; S190I, D486S
15	pXCS868	L142C-N371C; V296I, D486S
	pXCS869	L142C-N371C; T54H, S190I, D486S
	pXCS870	L142C-N371C; T54H, V296I, D486S
	pXCS871	L142C-N371C; S190I, V296I, D486S
	pXCS872	L142C-N371C; T54H, S190I, V296I, D486S
20	pXCS873	S155C-S290C; T54H, D486S
	pXCS874	S155C-S290C; S190I, D486S
	pXCS875	S155C-S290C; V296I, D486S
	pXCS876	S155C-S290C; T54H, S190I, D486S
	pXCS877	S155C-S290C; T54H, V296I, D486S
	pXCS878	S155C-S290C; S190I, V296I, D486S
	pXCS879	S155C-S290C; T54H, S190I, V296I, D486S
	pXCS880	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, S190I, D486S, E487Q, D489S
	pXCS881	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, V296I, D486S, E487Q, D489S
	pXCS882	S55C-L188C; L142C-N371C; T54H, S190I, V296I, D486S, E487Q, D489S

pXCS886	T103C-I148C; T54H, S190I, D486S, E487Q, D489S
pXCS888	T103C-I148C; T54H, S190I, V296I, D486S, E487Q, D489S

5 **Ejemplo 2. Construcción del Vector de Expresión del mutante F de RSV**

Una molécula de ácidos nucleicos que codifica la A2 de RSV nativo del polipéptido F0 establecido en SEQ ID NO:1 tiene las sustituciones de origen natural P102A, I379V y

10 M447V que se hicieron mutar utilizando técnicas de biología molecular estándar para codificar un polipéptido precursor para un mutante F de RSV que tenga las mutaciones de aminoácidos introducidas deseadas. La estructura y componentes del polipéptido precursor se establecen en la

15 Figura 1 y SEQ ID NO:3. El polipéptido precursor comprende un péptido de señal (residuos 1-25), polipéptido F2 (residuos 26-109), pep27 polipéptido (residuos 110-136), polipéptido F1 (residues137-513), fibritina T4 plegada (residuos 518-544), secuencia de reconocimiento de trombina (547-552), etiquetas

20 de purificación (etiqueta de HIS (residuos 553-558)), etiqueta Strep II (residuos 561-568), y secuencias de enlazador (residuos 514-517, 545, 546, 559, y 560).

La secuencia de proteínas de SEQ ID NO:3 se presentó para la optimización del codón de mamífero y síntesis por ADN 2.0 (Menlo Park, CA). El producto génico sintetizado se introdujo en un vector de expresión
5 comercialmente disponible, pADNc3.1/Zeo(+) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) que se modificó para codificar resistencia a kanamicina en lugar de resistencia a ampicilina y codificar el promotor de CAG [Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J., Efficient selection for high-expression
10 transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), 193-199, 1991] en lugar del promotor de CMV. Se designaron oligonucleótidos mutagénicos con el algoritmo de Diseño de Cebador QuikChange (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), y todos los oligonucleótidos se adquirieron de Integrated DNA
15 Technologies (Coralville, IA). Las sustituciones, inserciones y supresiones de nucleótidos se incorporaron con el Kit de Mutagénesis de Múltiples Sitios Dirigidos con Iluminación QuikChange (Agilent Technologies). Después de la digestión de la plantilla de plásmido original con *DpnI*, el alelo F
20 mutagenizado se reamplificó con la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) con una ADN polimerasa Q5 de alta fidelidad (New England Biolabs, Ipswich, MA) o ADN polimerasa de

PrimeSTAR HS (mezcla previa) (Takara/Clontech, Mountain View, CA), y el producto resultante se insertó en un vector de expresión de mamífero con el Kit de Ensamblaje de ADN NEBuilder HiFi (New England Biolabs) o con la Mezcla de Ensamblaje Maestro Gibson (New England Biolabs). La presencia de la secuencia pretendida se confirmó por secuenciación de ADN. El ADN de plásmido para la transfección en células Expi293 se purificó con el Kit MiniPrep Spin QIAprep (Qiagen, Valencia, CA), o con el Kit para Mega Plásmidos EndoFree (Qiagen). Para todos los kits o reactivos comerciales, los procedimientos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 3. Expresión y Purificación de Mutantes de Proteína F de RSV

La evaluación de la proteína para el mutante de proteína F de RSV se produjo por la transfección transitoria de células Expi293F (ThermoFisher, Waltham, MA) con constructos de ADN ensamblados y preparados como se describe en el Ejemplo 2. Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El cultivo celular aclarado se concentró 5-10 veces

utilizando filtración de flujo tangencial, seguida por el intercambio de solución reguladora en una solución reguladora estable para su captura en una columna Ni-IMAC. El medio de cultivo celular acondicionado que contenía la proteína F soluble se cargó sobre una columna Ni-IMAC. El producto se eluyó utilizando concentraciones incrementadas de imidazol. Las fracciones que contenían producto se agruparon y después se cargaron en una columna con Strep-Tactina (IBA Life Sciences, Goettingen, Alemania). El producto se eluyó a partir de la columna con Strep-Tactina utilizando concentraciones incrementadas de destiobiotina. Las fracciones que contenían producto se agruparon y dializaron en la solución reguladora de almacenamiento final. Los sobrenadantes de cultivo sin purificar y proteínas purificadas se utilizaron para los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en la presente.

Ejemplo 4: Estabilidad de los Mutantes de Proteína F de RSV

La estabilidad de los mutantes de proteína F de RSV diseñados se evaluó por pruebas de tensión y experimentos de estabilidad en almacenamiento. Durante la prueba de tensión

térmica, los sobrenadantes en cultivo sin purificar de los mutantes diseñados se incubaron durante 1 hora a 50°C o 60°C y se sondearon con el anticuerpo D25 monoclonal específico previo a la fusión y el anticuerpo AM14 específico del trómero previo a la fusión en los ensayos ELISA. La relación de la reactividad del anticuerpo de la muestra tensionada contra la no tensionada se define como el parámetro de Esfuerzo a la tracción. Se esperó que los mutantes más estables tuvieran una mayor Esfuerzo a la tracción. Durante los ensayos de estabilidad en almacenamiento, se comparó la reactividad del anticuerpo previa a la fusión en los sobrenadantes en cultivo sin purificar después de una semana de almacenamiento a 4°C con la reactividad de los sobrenadantes en cultivo recién preparado. La relación de actividad se definió como la estabilidad en almacenamiento del mutante.

Los resultados se presentan en las Tablas 7A-7C y 8A-8C. La Esfuerzo a la tracción se calculó como la reactividad de mAb específica previa a la fusión fraccionada restante después de la tensión ("NR" - No se detectó reactividad, "ND" - No determinada). Las sustituciones de aminoácidos más estabilizantes identificadas a partir de las

pantallas de los mutantes individuales de disulfuro diseñados, mutantes de carga de cavidad y mutantes electrostáticos (estabilidad previa a la fusión definida por la actividad de D25 restante después de la tensión térmica) se combinaron en los mutantes de combinación. Estos mutantes de combinación también se sometieron a la tensión térmica y se sondearon con dos anticuerpos monoclonales - D25 (específico y previo a la fusión) y AM14 (específico al trímero previo a la fusión). El epítipo cuaternario específico del trímero previo a la fusión reconocido por el anticuerpo AM14 fue significativamente más sensible a la tensión térmica que el epítipo D25 (Tabla 8B). No se retuvo reactividad de AM14 significativa después de una tensión a 60°C stress por ninguno de los mutantes de combinación, incluso la mayoría de los mutantes retuvieron reactividad a D25 después de la tensión térmica a 60°C. Esta observación proporciona una evidencia importante que el anticuerpo AM14 es un indicador mucho más preciso de la pérdida de estructura previa a la fusión, y en particular, de la pérdida del estado trimérico previo a la fusión.

20

Tabla 7A. Estabilidad en almacenamiento térmico para los mutantes que contienen disulfuro diseñados

	ID del Mutante	Esfuerzo a la tracción de D25 a 50 °C	Esfuerzo a la tracción de D25 a 60 °C	Estabilidad del almacenamiento
	pXCS507	0.45±0.09	<0.05	0.58
	pXCS519	1.07±0.18	NR	0.75
5	pXCS524	0.64±0.08	NR	1.00
	pXCS544	0.52±0.04	NR	0.76
	pXCS545	0.97±0.12	0.52±0.13	baja expresión
	pXCS546	1.11±0.09	0.43±0.09	baja expresión
	pXCS547	1.00±0.04	0.49±0.11	0.96
10	pXCS548	1.04±0.08	0.45±0.10	baja expresión
	pXCS549	0.66±0.09	0.24±0.07	1.03
	pXCS550	0.83±0.02	0.19±0.04	1.06
	pXCS551	0.72±0.08	NR	baja expresión
	pXCS553	1.12±0.08	0.33±0.03	1.31
15	pXCS554	2.08±0.19	0.41±0.08	baja expresión
	pXCS596	0.86±0.09	0.02	0.80
	pXCS597	0.50±0.05	0.05	1.07
	pXCS598	0.75±0.03	0.13±0.03	1.09
	pXCS599	0.68±0.10	0.02	0.95
20	pXCS600	0.87±0.09	0.15±0.04	0.90
	pXCS601	0.71±0.08	0.04	0.57

5	pXCS602	0.75±0.03	0.06±0.01	0.58
	pXCS603	0.67±0.06	0.12±0.02	0.40
	pXCS604	0.74±0.03	ND	baja expresión
	pXCS605	0.71±0.04	0.16±0.03	0.00
	pXCS606	0.76±0.06	NR	baja expresión
10	pXCS607	NR	NR	baja expresión
	pXCS608	0.62±0.14	NR	0.00
	pXCS609	0.76±0.08	0.08±0.01	0.28
	pXCS610	0.34±0.06	NR	0.00
	pXCS611	0.35±0.11	NR	baja expresión
15	pXCS612	NR	NR	baja expresión
	pXCS613	0.3	NR	0.00
	pXCS617	1.04±0.04	0.43±0.04	0.50
	pXCS618	1.01±0.07	0.30±0.08	baja expresión
	pXCS619	1.04±0.08	0.34±0.07	0.57
20	pXCS620	ND	ND	baja expresión
	pXCS621	0.87±0.03	0.14±0.02	0.62
	pXCS622	ND	ND	baja expresión
	pXCS623	0.91±0.03	0.26±0.03	baja expresión
	pXCS624	0.87±0.06	0.18±0.04	0.67
	pXCS628	0.83±0.04	0.16±0.02	0.71

pXCS629	1.01±0.06	0.04±0.03	1.00
pXCS630	0.61±0.04	NR	0.00

Tabla 7B. Estabilidad en almacenamiento térmico de

5 los mutantes que contienen mutaciones de carga de cavidad

	ID del Mutante	Esfuerzo a la tracción de D25 a 50 °C	Esfuerzo a la tracción de D25 a 60 °C	Estabilidad del almacenamiento
	pXCS565	0.61±0.06	0.03±0.01	0.74
	pXCS571	0.46±0.05	NR	0.81
10	pXCS592	0.38±0.07	NR	0.025

Tabla 7C. Estabilidad en almacenamiento térmico de

los mutantes que contienen mutaciones electrostáticas

	ID del Mutante	Esfuerzo a la tracción de D25 a 50 °C	Esfuerzo a la tracción de D25 a 60 °C	Estabilidad del almacenamiento
	pXCS658	1.05±0.05	0.30±0.03	0.71
	pXCS660	1.03±0.03	NR	0.94
	pXCS664	0.87±0.03	NR	0.76

Tabla 8A. Estabilidad en almacenamiento térmico de los mutantes que contienen dobles mutaciones de combinación

5	ID del Mutante	Esfuerzo a la tracción de D25 a 50 °C	Esfuerzo a la tracción de D25 a 60 °C	Estabilidad del almacenamiento
	pXCS674	0.73±0.09	0.53±0.07	1.47
	pXCS683	1.10±0.02	0.4	baja expresión
	pXCS684	1.05±0.01	0.46±0.04	baja expresión
	pXCS685	1.10±0.02	0.70±0.06	baja expresión
10	pXCS686	1.17±0.08	0.63±0.05	baja expresión
	pXCS687	1.10±0.04	0.50±0.03	baja expresión
	pXCS688	1.09±0.03	0.56±0.08	baja expresión
	pXCS689	1.06±0.02	0.44±0.07	baja expresión
	pXCS690	1.06±0.06	0.50±0.03	0.27
15	pXCS693	0.70±0.05	0.08±0.01	0.54
	pXCS697	0.49±0.04	0.06	baja expresión
	pXCS698	NR	NR	baja expresión
	pXCS699	0.31±0.05	NR	baja expresión
	pXCS700	0.65±0.05	0.03	0.67
20	pXCS701	0.36	NR	baja expresión
	pXCS702	0.48±0.02	NR	baja expresión

Tabla 8B. Estabilidad en almacenamiento térmico de los mutantes que contienen triples mutaciones de combinación

La Esfuerzo a la tracción se calculó como la reactividad de mAb (D25) específico previo a la fusión fraccionada y el mAb (AM14) específico del trímero previo a la fusión restante después de la tensión. "NR" - No se detectó reactividad, "ND" - No determinada.

ID del Mutante	Resistance de AM14 a 50 °C	Esfuerzo a la tracción de D25 a 60 °C	Estabilidad del almacenamiento
pXCS734	0.61	0.31±0.00	1.09±0.06
pXCS735	0.70	0.37±0.04	0.73±0.13
pXCS738	0.72	0.37	0.58±0.10
pXCS740	0.69	0.41±0.06	1.03±0.11
pXCS749	ND	0.00±0.10	0.65±0.15
pXCS752	ND	0.00±0.10	0.62±0.05
pXCS754	ND	0.00±0.10	1.19±0.06
pXCS758	0.70	0.22±0.04	1.32±0.03
pXCS760	ND	0.82±0.04	0.66±0.22
pXCS774	1.00±0.16	0.74±0.03	0.74±0.10
pXCS776	1.40±0.21	1.08±0.09	0.30±0.16
pXCS777	1.03±0.17	1.17±0.05	0.54±0.21

5	pXCS778	1.14±0.18	0.36±0.07	0.34±0.06
	pXCS779	0.85±0.15	0.00±0.00	0.51±0.08
	pXCS780	0.70±0.17	0.11±0.00	0.82±0.08
	pXCS781	0.88±0.17	0.00±0.10	0.94±0.05
	pXCS782	0.55±0.18	0.07±0.01	0.67±0.13
10	pXCS785	1.01±0.18	0.00±0.10	1.08±0.18
	pXCS787	0.82±0.17	0.14±0.01	0.82±0.19
	pXCS804	0.79±0.11	0.19±0.01	0.98±0.08
	pXCS805	0.72±0.15	0.24±0.01	0.78±0.24
	pXCS806	0.40±0.13	0.16±0.03	0.79±0.13
15	pXCS809	0.84±0.12	0.29±0.04	0.82±0.11
	pXCS811	0.67±0.10	0.30±0.04	1.03±0.16
	pXCS827	0.88±0.07	0.06	0.50±0.10
	pXCS830	1.01±0.15	0.14±0.02	0.53±0.10
	pXCS839	0.82±0.06	0.55±0.03	0.57±0.14
20	pXCS842	0.87±0.14	0.88±0.02	0.57±0.10
	pXCS845	1.00±0.11	1.11±0.11	0.50±0.20
	pXCS847	0.92±0.14	0.74±0.01	0.54±0.11
	pXCS848	1.24±0.12	1.00±0.03	0.15±0.29
	pXCS849	0.92±0.30	1.08±0.10	0.59±0.14
	pXCS850	0.88±0.22	0.70±0.01	0.75±0.16

5	pXCS851	0.95±0.09	0.84±0.05	0.79±0.10
	pXCS852	0.86±0.13	0.78±0.02	0.89±0.03
	pXCS853	0.98±0.10	0.10±0.01	0.53±0.11
	pXCS854	0.93±0.08	0.08±0.01	0.55±0.14
	pXCS855	0.94±0.10	0.81±0.07	0.53±0.10
10	pXCS856	0.97±0.10	0.78±0.00	0.59±0.12
	pXCS857	0.90±0.14	0.11	0.91±0.07
	pXCS858	0.95±0.10	0.78±0.08	0.94±0.06
	pXCS873	0.77±0.22	1.11±0.01	0.36±0.13
	pXCS874	0.93±0.20	0.46±0.01	0.78±0.19
15	pXCS875	0.62±0.16	0.23±0.00	0.50±0.10
	pXCS876	0.90±0.20	1.06±0.04	0.52±0.10
	pXCS877	0.49±0.20	1.09±0.00	0.41±0.09
	pXCS878	0.66±0.16	0.40±0.04	0.47±0.16
	pXCS879	0.82±0.20	0.84±0.04	0.50±0.20
20	pXCS880	0.68±0.20	0.87±0.07	0.46±0.15
	pXCS881	0.68±0.23	0.92±0.03	0.47±0.26
	pXCS882	0.75±0.21	0.94±0.01	0.44±0.16
	pXCS883	0.81±0.13	0.40±0.01	0.47±0.24
	pXCS884	0.69±0.15	0.43±0.05	0.45±0.17
	pXCS885	0.60±0.21	0.47±0.01	0.45±0.13

5

pXCS886	0.89±0.13	0.70±0.02	0.45±0.14
pXCS888	0.86±0.14	0.81±0.05	0.43±0.10
pXCS889	0.99±0.14	0.00±0.10	0.86±0.10
pXCS890	0.72±0.34	0.10±0.03	1.08±0.05
pXCS891	0.93±0.06	0.08±0.01	1.08±0.06
pXCS892	0.95±0.13	0.18±0.01	1.09±0.04
pXCS897	0.60±0.28	0.42±0.04	0.67±0.37
pXCS898	0.94±0.46	0.48±0.05	0.81±0.19
DS-Cav1	0.60	0.22	0.90

10

Tabla 8C: Estabilidad térmica de un mutante desprovisto de un dominio plegado de trimerización (pXCS899)

15

ID del Mutante	Resistencia de AM14 a 50 °C	Resistencia de AM14 a 60 °C	Resistencia de AM14 a 60 °C	Esfuerzo a la tracción de D25 a 60 °C
pXCS899	0.684	0.323	0.906	0.287

20 **Ejemplo 5: Integridad de conformación de los Mutantes de la Proteína F con un Panel de Anticuerpos Monoclonales.**

El propósito del estudio fue identificar mutantes de proteína F de RSV que mantuvieran la integridad

estructural de una conformación F de RSV previa a la fusión, incluyendo la conformación y asociación del trímero previo a la fusión. Cada mutante se probó contra los mAb de un panel de referencia que incluía dos mAb específicos (AM22 y D25) en el sitio ø- y previos a la fusión, un mAb (MPE8) también específico que se unía a un epítopo cercano al sitio II previo a la fusión, un mAb específico al sitio II que se unía previo a la fusión y después de la fusión F (palivizumab, Synagis®), un mAb específico (AM14) del trímero previo a la fusión y un anticuerpo específico al sitio IV que se unía previo a la fusión y después de la fusión F (101F). Los mutantes de proteína F de RSV se mantuvieron en una conformación previa a la fusión donde se esperaba se unieran a todos los anticuerpos de referencia probados.

Se utilizó el instrumento OCTET HTX (ForteBio, Pall Corporation, Port Washington, NY) que mide la cinética de las interacciones biomoleculares en tiempo real, para evaluar la reactividad e anticuerpos para cada mutante. Los experimentos se llevaron a cabo con agitación a 1000 rpm, a una temperatura de 30°C en placas negras de 96 pozos (Greiner Bio-One, Monroe, NC) con un volumen final de 200 µL por pozo. Las puntas del biosensor anti-HIS se equilibraron en una

solución salina regulada por fosfato (PBS), albúmina de suero de bovino (BSA) al 2%, Tween 20 (PBT) al 0.05% durante 10 min antes de comenzar las mediciones de unión. Las proteínas mutantes etiquetadas con HIS se capturaron por los biosensores de anti-HIS durante 5 min. EL valor de referencia se estableció en PBT durante 3 min antes de la etapa de asociación con anticuerpos 20 nM en PBT durante 10 min. La disociación de todos los anticuerpos se dejó durante 20 min en los mismos pozos utilizados para establecer el valor de referencia. El software de análisis de datos OCTET (versión 8.2, Pall Corp.) se utilizó para el análisis cinético con base en el ajuste de la curva de asociación y etapas de disociación y se supuso una interacción de unión reversible de 1:1. Las respuestas de unión (nm de desplazamiento) para cada uno de los mutantes con diversos anticuerpos monoclonales de referencia se presentan en las Tablas 9A y 9B. Se consideró un valor de respuesta negativo < 0.10 y fue el límite de detección (LOD) para este ensayo. Los valores ≥ 0.10 se consideraron positivos e indicaron la unión del anticuerpo a los mutantes individuales. Se observaron grados variantes de unión a través de los mutantes y con cada anticuerpo. Sin embargo, la mayoría de los mutantes de

combinación se unieron 101F y Synagis mientras que mutantes tales como pXCS735 y pXCS776 mostraron por ejemplo una pérdida de unión en al menos un mAb específico previo a la fusión. La pérdida de unión indicó una carencia de una
 5 conformación intacta previa a la fusión.

Tabla 9A. Resultados de OCTET para los Anticuerpos Específicos Previos a la Fusión

ID del Mutante	Respuesta (nm de desplazamiento)			
	AM22	D25	MPE8	AM14
pXCS734	0.284	0.590	0.818	0.931
pXCS735	LoD	0.302	0.375	0.442
pXCS738	0.273	0.545	0.741	0.899
pXCS740	0.172	0.422	0.546	0.524
pXCS749	LoD	0.153	0.206	0.178
pXCS752	0.234	0.463	0.703	0.641
pXCS754	0.298	0.562	0.676	0.816
pXCS758	0.273	0.589	0.816	0.772
pXCS760	0.121	0.176	0.151	0.203
pXCS774	0.340	0.595	0.795	0.738

5	pXCS776	LoD	LoD	0.127	LoD
	pXCS777	0.121	0.201	0.270	0.285
	pXCS778	LoD	LoD	LoD	0.121
	pXCS779	0.125	0.200	0.232	0.329
	pXCS780	0.290	0.495	0.608	0.684
10	pXCS781	0.423	0.666	0.876	1.053
	pXCS782	0.222	0.378	0.513	0.580
	pXCS785	0.465	0.727	0.937	0.955
	pXCS787	0.225	0.464	0.621	0.445
	pXCS804	0.267	0.432	0.605	0.522
15	pXCS805	0.173	0.282	0.443	0.355
	pXCS806	0.152	0.252	0.347	0.330
	pXCS809	0.185	0.281	0.392	0.444
	pXCS811	0.322	0.490	0.638	0.714
	pXCS827	0.450	0.692	0.880	0.881
20	pXCS830	0.465	0.707	0.923	0.878
	pXCS839	0.390	0.593	0.782	0.731
	pXCS842	0.493	0.780	0.932	0.930
	pXCS845	0.314	0.495	0.699	0.653
	pXCS847	0.484	0.732	0.871	0.935

5	pXCS848	0.109	0.188	0.266	0.235
	pXCS849	0.430	0.668	0.908	0.886
	pXCS850	0.517	0.839	1.038	1.018
	pXCS851	0.508	0.824	1.025	1.027
	pXCS852	0.565	0.881	1.126	1.144
10	pXCS853	0.484	0.746	0.905	0.883
	pXCS854	0.453	0.693	0.886	0.884
	pXCS855	0.523	0.778	0.982	0.992
	pXCS856	0.568	0.827	1.063	1.094
	pXCS857	0.563	0.890	1.091	1.110
15	pXCS858	0.547	0.840	1.061	1.097
	pXCS873	0.192	0.398	0.537	0.434
	pXCS874	0.444	0.681	0.851	0.771
	pXCS875	0.205	0.459	0.623	0.540
	pXCS876	0.268	0.523	0.702	0.600
20	pXCS877	0.213	0.419	0.573	0.525
	pXCS878	0.324	0.666	0.812	0.833
	pXCS879	0.351	0.680	0.826	0.804
	pXCS880	0.213	0.563	0.684	0.505
	pXCS881	0.178	0.556	0.763	0.623

5	pXCS882	0.219	0.516	0.691	0.463
	pXCS883	0.233	0.553	0.704	0.484
	pXCS884	0.323	0.576	0.784	0.714
	pXCS885	0.105	0.327	0.408	0.239
	pXCS886	0.443	0.715	0.863	0.872
10	pXCS888	0.434	0.726	0.878	0.875
	pXCS889	0.477	0.720	0.889	0.870
	pXCS890	0.538	0.778	0.999	0.994
	pXCS891	0.461	0.719	0.920	0.828
	pXCS892	0.542	0.756	1.032	1.000
15	pXCS897	0.406	0.605	0.745	0.740
	pXCS898	0.416	0.614	0.816	0.795
	DS Cav1	0.469	0.714	0.810	0.842

15 Nota: LoD =Límite de detección, ND = No determinado

Tabla 9B. Resultado de OCTET para los Anticuerpos

101F y Synagis

20	Respuesta (nm de desplazamiento)		
	ID del Mutante	101F	Synagis
	pXCS734	0.843	0.653
	pXCS735	0.813	0.560

5	pXCS738	0.774	0.519
	pXCS740	0.759	0.611
	pXCS749	0.629	0.480
	pXCS752	0.739	0.520
	pXCS754	0.665	0.394
10	pXCS758	0.743	0.431
	pXCS760	0.345	0.334
	pXCS774	0.742	0.530
	pXCS776	0.139	0.123
	pXCS777	0.389	0.329
15	pXCS778	0.118	0.124
	pXCS779	0.340	0.286
	pXCS780	0.623	0.471
	pXCS781	0.786	0.536
	pXCS782	0.615	0.468
20	pXCS785	0.763	0.580
	pXCS787	0.615	0.547
	pXCS804	0.788	0.574
	pXCS805	0.810	0.598
	pXCS806	0.865	0.621

5	pXCS809	0.687	0.554
	pXCS811	0.768	0.606
	pXCS827	0.973	0.898
	pXCS830	0.901	0.839
	pXCS839	0.900	0.880
10	pXCS842	0.942	0.853
	pXCS845	0.798	0.782
	pXCS847	0.941	0.960
	pXCS848	0.400	0.394
	pXCS849	0.999	0.991
15	pXCS850	1.040	1.076
	pXCS851	0.991	1.002
	pXCS852	1.072	1.014
	pXCS853	0.842	0.878
	pXCS854	0.851	0.857
20	pXCS855	0.914	0.894
	pXCS856	0.957	0.935
	pXCS857	1.016	1.056
	pXCS858	0.981	1.010
	pXCS873	0.809	0.798
	pXCS874	0.881	0.844

5	pXCS875	0.912	0.833
	pXCS876	0.820	0.727
	pXCS877	0.842	0.823
	pXCS878	0.832	0.776
	pXCS879	0.838	0.725
10	pXCS880	0.693	0.735
	pXCS881	0.812	0.786
	pXCS882	0.651	0.714
	pXCS883	0.719	0.807
	pXCS884	0.798	0.792
15	pXCS885	0.666	0.737
	pXCS886	0.807	0.853
	pXCS888	0.839	0.873
	pXCS889	1.020	0.946
	pXCS890	0.999	0.949
20	pXCS891	0.919	0.851
	pXCS892	0.960	0.889
	pXCS897	0.939	0.901
	pXCS898	0.802	0.773
	DS Cav1	0.821	0.704

Ejemplo 6. Análisis de peso molecular y distribución de tamaños de mutantes F de RSV previos a la fusión seleccionados.

Los mutantes F estabilizados previos a la fusión F
5 se analizaron por SDS-PAGE seguidos por transferencia western
con el anticuerpo L4 monoclonal específico para F de RSV
[Walsh EE, Cote PT, Fernie BF et al. Analysis of the
Sintitical Respiratory Virus Fusion Protein Using Monoclonal
and Policlonal Antibodies. J. Gen. Virol. 76: 505-513, 1986.].
10 La Figura 2A muestra los perfiles de movilidad con SDS-PAGE
para los mutantes pXCS847, pXCS851 y pXCS852 y DS-Cav1
representativos. En todos los casos, una banda mayor con un
peso molecular aparente entre 55 y 60 kDa, como se esperaba
para los mutantes monoméricos F de RSV, estuvo presente bajo
15 condiciones no reductoras. EL ligero cambio observado en la
movilidad entre DS-Cav1 y los mutantes pXCS847, pXCS851,
pXCS852 podría ser debido a la naturaleza de los enlaces
disulfuro individuales y el efecto resultante en la
compactación general de la proteína en el estado no plegado y
20 capacidad de acceso a SDS.

La Figura 2B describe pesos moleculares y
distribuciones de tamaño de los mutantes pXCS847, pXCS851,

pXCS852, y DS-Cav1 en solución bajo condiciones nativas. Los pesos moleculares y distribuciones de tamaño se estimaron a partir del análisis de velocidad de sedimentación utilizando la ultracentrífuga analítica. La proteína purificada se
5 centrifugó a 35,000 rpm, a 20°C, y la absorbancia UV a través de las celdas de muestra se monitoreó a 280 nm. Los datos se ajustaron en las distribuciones $c(s)$ continuas, suponiendo la misma relación de fricción para todas las especies que se sedimentaron en la celda. Todas las proteínas sedimentadas
10 con un coeficiente de sedimentación de ~ 7.6 S y peso molecular aparente de ~ 180 kDa, indicaron que las proteínas purificadas eran triméricas en solución. El peso molecular esperado del trimero F de RSV, calculado a partir de su composición de aminoácidos es de 171 kDa.

15

Ejemplo 7. Espectroscopia por Dicroísmo Circular para caracterizar la Integridad Secundaria y Terciaria de los Mutantes de Proteína F de RSV Designados.

Se registraron ambos espectros lejos y cerca de UV
20 de CD en un espectropolarímetro de registro automatizado Jasco J-810, equipado con un soporte de celdas controlado por temperatura tipo Peltier de 6 posiciones. Los espectros lejos

UV de CD se registraron a una concentración de 0.10-0.12 mg/ml de proteína en 1x PBS, pH 7.4, en celdas de cuarzo rectangular de 1 mm entre 200 y 260 nm cada 0.1 nm a 100 nm/min, con un ancho de banda de 3 nm. Se recolectaron
5 cinco espectros y se promediaron para cada muestra. Los espectros cercanos a UV de CD se registraron a una concentración de proteína de 0.4-0.5 mg/ml en 1x PBS, pH 7.4, en celdas de cuarzo rectangular de 1 cm entre 250 y 320 nm cada 0.1 nm a 100 nm/min, con un ancho de banda de 3 nm. Se
10 recolectaron cinco espectros y se promediaron también para cada muestra. Los datos se corrigieron para las contribuciones del valor de referencia de la solución reguladora y se normalizaron para cualquier elíptica media de residuos (lejos de UV de CD) o elíptica molar (cerca de UV de
15 CD), utilizando relaciones establecidas.

Los resultados se muestran en las Figuras 3A y 3B. Ambos datos lejos y cerca de UV de CD mostraron que todas las proteínas retuvieron su estructura secundaria y terciaria bien definida. Además, una similaridad obvio de los espectros
20 lejos y cerca de UV CD indicó que las estructuras secundaria y terciaria de los mutantes fueron similares, y se conservó la integridad estructural de las proteínas.

Ejemplo 8. Estabilidad Estructural de los Mutantes de Proteína F de RSV diseñados

Se caracterizó la estabilidad estructural de los mutantes purificados de proteína F de RSV utilizando calorimetría por barrido diferencial (DSC). Los experimentos con DSC se llevaron a cabo en un microcalorímetro VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA). La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente y se corrigió para la contribución del barrido en luz visible. Las muestras de proteína en 1x PBS, pH 7.4 a 0.2-0.5 mg/mL (concentración micromolar del trímero de 1.0-2.4) se escanearon de 10°C a 80°C en 90°C/hr, con un tiempo de respuesta de 8 segundos y un tiempo de equilibrio previo al escaneo de 5 minutos. Dependiendo del número de transiciones observadas en los termogramas, los perfiles de capacidad térmica se ajustaron en los modelos no plegados de 2 o 3 etapas utilizando el software Origin 7.0 provisto por el fabricante del DSC. Las temperaturas de fusión de las primeras transiciones que se observaron se proporcionan como las temperaturas de fusión de cada mutante.

Los datos de DSC mostraron al menos que todos los mutantes diseñados son más estables que DS-Cav1 (Tabla 10).

Las temperaturas de fusión (definidas como DSC máxima del primer pico de DSC que se observa en cada experimento, Tabla 10) de todos los mutantes (con excepción de pXCS738) fueron mayores que DS-Cav1 por hasta 18°C. Los datos de DSC mostraron que el diseño de proteínas por computadora descrito en el Ejemplo 1 tuvo éxito al producir mutantes F de RSV significativamente más estables que también retuvieron una conformación previa a la fusión (datos de Octeto, Ejemplo 5).

Tabla 10. Temperaturas de fusión de los mutantes de proteína F de RSV.

Las temperaturas de fusión se calcularon a partir de experimentos con DSC (como se describe en el Ejemplo 8).

ID del Mutante	T_{m1} , °C
DS-Cav1	52.9±0.0
pXCS738	52.5±0.1
pXCS780	65.2±0.0
pXCS830	58.3±0.0
pXCS847	68.4±0.0
pXCS851	70.4±0.0
pXCS852	69.2±0.0
pXCS853	65.2±0.0
pXCS855	69.3±0.0
pXCS874	54.8±1.0
pXCS881	70.6±0.0
pXCS898	59.6±0.5

Ejemplo 9. Mecanismo de Pérdida de la Conformación del Trímero Previo a la Fusión.

Para caracterizar una ruta estructural específica que lleve a la pérdida de la conformación previa a la fusión, se sometió DS-Cav1 purificado a pruebas de tensión térmica. La glicoproteína purificada (0.5 mg/ml en 1x PBS, pH 7.4) se incubó a 50°C y 60°C durante 30, 60 y 120 minutos. La unión del mAb D25 específico previo a la fusión y el mAb AM14 específico del trímero previo a la fusión en la proteína tensionada se evaluó mediante experimentos con ELISA como se describe en el Ejemplo 4). La integridad estructural de la proteína se caracterizó mediante CD y DSC como se describe en los Ejemplos 7 y 8, respectivamente. Los resultados se muestran en las Figuras 4-6.

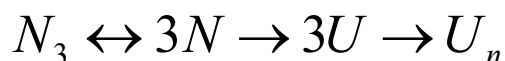
Las reactividades relativas de AM14 y D25 de las muestras tensionadas se muestran en la Figura 4. Ambas reactividades de D25 y AM14 de DS-Cav1 permanecieron sin cambiar en gran medida después de hasta 2 horas de incubación a 50°C. En contraste, la reactividad para ambos previa a los anticuerpos específicos de la fusión se perdió de forma progresiva durante el tratamiento a 60°C. Además, la reactividad de AM14 se perdió más rápidamente que al

reactividad de D25, indicando que el epítipo de AM14 cuaternario previo a la fusión se interrumpe más temprano que el epítipo de D25. El resultado destacó una ventaja del anticuerpo AM14 como una sonda para la detección de la
5 pérdida de la conformación del trímero previo a la fusión.

La evaluación de DSC de DS-Cav1 no tensado (Figura 5) muestra que la proteína sufrió una transición de conformación reversible entre 50°C y 60°C. Esta transición no corresponde a la pérdida de la conformación previa a la
10 fusión, la cual es irreversible. Además, esta transición no resultó del despliegue global de la proteína cuando DS-Cav1 retiene espectros definidos lejos y cerca de UV de CD (Figuras 6A y 6B), indicando que la proteína permaneció plegada bajo estas condiciones. La explicación más probable
15 de la transición de DSC observada es la pérdida reversible de la estructura cuaternaria de la proteína, es decir, al menos una disociación local del trímero previo a la fusión. Esta disociación se requiere para las etapas iniciales hacia la pérdida de la conformación previa a la fusión, puesto que ni
20 la reactividad de AM14 ni la de D25 se perdió de forma apreciable antes de que la transición se llevara a cabo (Figura 4, datos de ELISA). Estos datos enfatizan la

importancia de la integridad del trímero para la estabilidad de la conformación previa a la fusión. La integridad del trímero únicamente puede confirmarse por la reactividad contra el anticuerpo AM14 específico del epítipo cuaternario, pero no en el sitio Ø del anticuerpo D25 específico.

Estos datos sugieren que la pérdida de la conformación previa a la fusión ocurre mediante la siguiente ruta:



10

El trímero nativo (N3) se disocia de forma reversible en monómeros nativos (3N), que pierden de forma lenta e irreversible la conformación previa a la fusión (3U) y en última instancia, forman especies de alta masa molecular (Un). A su vez, la disociación del trímero significa que DS-Cav1 desplegará una resistencia dependiente de la concentración de proteínas contra la tensión térmica: una reducción en la concentración total de la proteína promoverá la disociación del trímero que a su vez, acelerará la pérdida de la conformación previa a la fusión. En contraste, los mutantes F estabilizados previos a la fusión (por ejemplo, 851) podrían mostrar o no una dependencia a la concentración

20

de su Resistencia a la tensión, siempre que se elaboren lo suficientemente estables. Las Figuras 7A y 7B proporcionan aún más evidencia experimental para apoyar esta hipótesis. Las muestras de proteína se diluyeron en serie y se
5 sometieron a una tensión de 50°C durante una hora. Las reactividades de AM14 y D25 permanecieron después de la tensión en relación con las muestras de control (sin tensión) se evaluaron en ensayos ELISA. La Resistencia a la tensión de DS-Cav1 mostró una dependencia pronunciada de la
10 concentración de proteína, como se determina por cualquier reactividad del anticuerpo AM14 (Figura 7A) o D25 (Figura 7B). En contraste, la Resistencia a la tensión de los mutantes estabilizados pXCS851 y pXCS898 permaneció sin cambiar en gran medida durante el mismo margen de concentración de
15 proteína.

Ejemplo 10: Mutantes Estabilizados de Proteína F de RSV en la Conformación Previa a la Fusión para Obtener Respuestas de Anticuerpos Neutralizantes en Ratones.

20 Se inmunizaron ratones hembra Balb/c con ya sea 0.025 µg o 0.25 µg de cualquiera de DS-Cav1, F de tipo silvestre, mutantes F de pXCS852, pXCS855, pXCS830, pXCS853,

pXCS780, pXCS898, pXCS851, pXCS874, pXCS881, pXCS738, o pXCS847, con o sin 0.1 mg por dosis de fosfato de aluminio como adyuvante. Las inmunizaciones se dieron de forma intramuscular en las semanas 0 y 3 (Tabla 11). Se evaluaron los sueros antes (semana 0) y después de la dosis 2 (PD2, semana 5) en un ensayo de neutralización de la subfamilia A de RSV como se describe con menores modificaciones [Eyles JE, Johnson JE, Megati S, et al. Nonreplicating vaccines can protect african green monkeys from the Memphis 37 strain of Sincitial Respiratoy Virus. J Inf Dis. 208(2):319-29, 2013.]. Brevemente, se determinaron los títulos del anticuerpo neutralizante como el factor de dilución en suero que resultaron en una reducción de 50% en unidades infecciosas. Los resultados se reportaron como el título de la media geométrica de 10 ratones por grupo. Los sueros con neutralización de virus no detectable se asignaron a un título de 20. Las veces de aumento en los títulos de la media geométrica a 50% se reportaron como la relación de la dosis posterior 2 (PD2) a los títulos previos a la inmunización dentro de cada grupo.

Tabla 11. Esquema de inmunización del estudio de inmunogenicidad de murino que compara los mutantes F previos a la fusión.

5	Dosis Previo a la fusión	Ag F	0.025 µg y 0.25 µg con y sin AlPO ₄ (0.1 mg/mL)
	Vacunación		Semana 0, 3
	Sangrado		Semana 0 (Pre) 3 (PD1) 5 (PD2)

10 Todos los mutantes probados obtuvieron una
 respuesta de anticuerpos neutralizante después de dos
 inmunizaciones en ratones (Tabla 12). En general, los títulos
 del anticuerpo fueron de forma consistente mayores en ambas
 dosis de antígeno para los mutantes 852, 830, 851, y 847,
 15 demostrando que estos mutantes fueron las formas más
 inmunogénicas de una glicoproteína F estabilizada de RSV
 previa a la fusión (Tablas 12 y 13, Figura 8).

20 Tabla 12. Títulos de la media geométrica al 50% del
 anticuerpo neutralizante en ratones Balb/c después de la
 inmunización con mutantes F previo a la fusión.

		0.025 μ g + AlPO4		0.25 μ g + AlPO4		0.025 μ g sin adyuvante		0.25 μ g sin adyuvante	
	ID del Mutante	Pre	PD2	Pre	PD2	Pre	PD2	Pre	PD2
5	pXCS738	20	72	20	632	20	21	20	27
	pXCS780	20	2373	20	1311	20	59	20	108
	pXCS830	20	2615	20	3219	20	45	20	265
	pXCS847	20	ND	20	ND	20	129	20	518
	pXCS851	20	1275	20	4393	20	59	20	237
10	pXCS852	20	1388	20	5100	20	135	20	331
	pXCS853	20	690	20	1225	20	69	20	535
	pXCS855	20	2004	20	1232	20	49	20	156
	pXCS874	20	77	20	2929	20	34	20	86
	pXCS881	20	53	20	2391	20	20	20	36
15	pXCS898	20	427	20	2642	20	39	20	87
	DS-Cav1	20	271	20	2319	20	23	20	87
	F de tipo silvestre	20	326	20	948	20	23	20	50
	ND, no realizado.								

20 Tabla 13. Veces de aumento de los títulos de anticuerpo neutralizante al 50% de ratones Balb/c después de la inmunización con mutantes F previos a la fusión.

	0.025 µg + AlPO ₄	0.25 µg + AlPO ₄	0.025 µg Sin adyuvante	0.25 µg Sin adyuvante
pXCS738	3.6	31.6	1.1	1.4
pXCS780	118.7	65.6	3.0	5.4
pXCS830	130.8	161.0	2.3	13.3
pXCS847	N/A	N/A	6.5	25.9
pXCS851	63.8	219.7	3.0	11.9
pXCS852	69.4	255.0	6.8	16.6
pXCS853	34.5	61.3	3.5	26.8
pXCS855	100.2	61.6	2.5	7.8
pXCS874	3.9	146.5	1.7	4.3
pXCS881	2.7	119.6	1.0	1.8
pXCS898	21.4	132.1	2.0	4.4
DS-Cav1	13.6	116.0	1.2	4.4
F de tipo silvestre	16.3	47.4	1.2	2.5
N/A, no disponible.				

15

La comparación de los títulos de anticuerpo neutralizante en PD2 al 50% con los datos de caracterización in vitro de sus mutantes correspondientes muestra la correlación entre el título del anticuerpo neutralizante en PD2 y la resistencia a la tensión térmica de AM14 (Figura 9). Este resultado sugiere que la unión de AM14 que es específica para el estado trimérico previo a la fusión, se correlaciona

con la inmunogenicidad de los mutantes.

**Ejemplo 11. Mutantes F de RSV que comprenden
Mutaciones Introducidas de Cisteína en la Región HRB**

5 11A. Preparación de mutantes F de RSV que
comprenden las mutaciones introducidas en la región HRB

Los mutantes F de RSV representativos que
comprenden mutaciones introducidas de cisteína en la región
HRB (aproximadamente en los aminoácidos 476 - 524 del
10 polipéptido F0) se proporcionan en la Tabla 14, donde se
observan las mutaciones específicas en esta región en cada
mutante. Además de las mutaciones en la región HRB, cada uno
de estos mutantes también incluye las mutaciones introducidas
S55C, L188C, T54H, y D486S. Estos mutantes se prepararon por
15 métodos similares a aquellos descritos en los Ejemplos 1-3.
En breve, se preparó un polipéptido precursor que consiste de
545 aminoácidos para cada mutante, que comprendía: (1)
aminoácidos 1-529 de la secuencia de SEQ ID NO:1 excepto para
una supresión de 41 aminoácidos entre los residuos 104 y 144;
20 (2) las mutaciones introducidas (S55C, L188C, T54H, y D486S)
fuera de la región HRB, (3) una secuencia de reconocimiento
de la proteasa trombina; (4) un dominio plegado; (5) una

etiqueta de HIS; (6) una Streptag II; (7) secuencias de enlazador; y (8) las mutaciones introducidas de cisteína como se observaron. El péptido de señal, que comprende los aminoácidos 1-25, se escindió del precursor durante el proceso de expresión. El dominio plegado también se escindió de los mutantes, lo cual se obtuvo por digestión con 500ug/ml de alfa-trombina de bovino (HTI) durante la noche a temperatura ambiente después del proceso de expresión.

Tabla 14: Mutantes de proteína F de RSV ejemplares que comprenden la mutación de disulfuro diseñada en la región HRB

ID del Mutante	Mutaciones en la Región HRB	SEQ ID NO de la Secuencia de aminoácidos del polipéptido Precursor
pXCS1106	K508C, S509C	272
pXCS1107	N515C, V516C	273
pXCS1108	T522C, T523C	274
pXCS1109	K508C, S509C, N515C, V516C	275
pXCS1110	K508C, S509C, T522C, T523C	276
pXCS1111	N515C, V516C, T522C, T523C	277
pXCS1112	K508C, S509C, N515C, V516C, T522C, T523C	278

11B. Estabilidad de los Mutantes F de RSV que comprenden Mutaciones Introducidas de Cisteína en la Región HRB

La estabilidad de los mutantes F de RSV provistos en la Tabla 14 se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8 y el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en las Tablas 15 y 16, respectivamente.

Tabla 15: Temperaturas de fusión de los mutantes de proteína F de RSV

ID del Mutante	T _{m1} , °C
pXCS1106	66.3
pXCS1108	66.7
pXCS1109	66.5
pXCS1110	67.0
pXCS1111	66.5
pXCS1112	67.2

Tabla 16: Estabilidad térmica de los mutantes que comprenden la mutación de disulfuro diseñada

La resistencia a la tensión se calculó como la reactividad de mAb específico fraccionado previo a la fusión

que permaneció después de la tensión. La proteína pXCS1106 purificada a partir de la cual se escindió el plegado, se diluyó en un medio acondicionado a una concentración de 12 µg/mL.

5	ID del Mutante	Resistencia de AM14 a 50°C	Resistencia a la tensión de AM14 a 60°C	Resistencia de D25 a 50°C	resistencia a la tensión de D25 a 60°C
	pXCS1106	1.041	0.720	1.080	1.019

Listado de secuencias sin procesar

10 **SEQ ID NO: 1. Secuencia de aminoácidos de F0 de A2**
de RSV nativo de longitud completa (GenBank GI: 138251;
Proteína Suiza P03420)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARRELPRFMNYTLNNA
 15 KKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLN
 GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 20 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLY
 CKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 2. Secuencia de aminoácidos de F0 de B de RSV Nativo de longitud completa (cepa 18537; GenBank GI: 138250; Proteína Suiza P13843)

MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIEL
 5 SNIKETKCNNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTINTT
 KNLNVSISKRRKRFLGFLGVSASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTSKVLDLKNIINNRLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEITREFSVNAGVT
 TPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPI
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYADNCGSVSFFFPQADTCKVQSNRVF
 10 CDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVTGKSTTNIMITTIIIVIIIVLLSLIAIGLLLY
 CKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSK

15 **SEQ ID NO: 3. Ectodominio F de A2 de RSV con plegado**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
 SNIKENKCNNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSKKRRKRFLGFLGVSASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
 20 GVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYADNCGSVSFFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVНКQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGSWSHPQFEK

5

**SEQ ID NO:4: Secuencia de Aminoácidos F Nativa de
 RSVa/Homo sapiens/USA/LA2_21/2013 de RSV (Ontario) (GenBank
 GI: AHX57185):**

MELPILKTNAITTLAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
 10 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANSRARRELPRFMNYTLNNT
 KNTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 15 CDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVНКQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLALIAVGLLLY
 CKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

20

**SEQ ID NO:5: Ectodominio F con plegado de RSVa/Homo
 sapiens/USA/LA2_21/2013 de RSV:**

MELPILKTNAITTLAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL

SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANSRARRELPRFMNYTLNNT
 KNTNVTLSKKRKRFLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 5 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYADNCGSVSFFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGWSHPQFEK

10

**SEQ ID NO:6: Secuencia de Aminoácidos F Nativa de RSVB/Homo
 sapiens/PER/FPP00592/2011 de RSV (Buenos Aires) (GenBank GI:
 AHV80758) :**

MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIEL
 15 SNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNYTINTT
 KNLNVSISKRKRFLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVKQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLLEITREFSVNAGVT
 TPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPI
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYADNCGSVSFFFPQADTCKVQSNRVF
 20 CDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVTGKSTTNIMITAIIVVIVVLLSLIAIGLLLY

CKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSK

SEQ ID NO:7: Ectodominio F con plegado de RSVB/Homo sapiens/PER/FPP00592/2011 de RSV:

5 MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIEL
 SNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTINTT
 KNLNVSISKKRKRRLGFLGVSAGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVT
 TPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPI
 10 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYADNCGSVSFFPQADTCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHGSWSHPQFEK

15

SEQ ID NO:8: Secuencia de Nucleótidos que codifica el Polipéptido Precursor de pXCS738:

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
 gcttcgcatcgggacagaaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcggtgtc
 20 caagggttacctctcggccctgagaactggctggtaccactgtgtgattactatcgagctg
 agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaagggtcaagctgattaagcagg
 aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgacccctgc

cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacaccctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggagggttctgggattcctgtgtg
gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtgcccggtgtccaaagtgtgcatctggaggggga
agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcggtgggtgtccctgagcaac
5 ggagtcagcgtgtgtacatccaagggtcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
tgcccatcgtcaacaagcagtcatgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
gcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgggagttttccgtgaacgccggagtgacc
actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
10 ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaaatcctcgctatgtgggtgcaattgcctctg
tacggagtcatcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
ccaaggaagggtccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctgggtattgcgataatgc
tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtcaaaccgcgtgttc
tgtgacaccatgtgtagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
15 ttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaagaccaaatagcactgcctcgaacaag
aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtg
acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccctgggtgttcccttccgacgagttc
20 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtccttgccttcatccggaagt
cggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc
ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctgggtgcc

cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):

Secuencia de señal:1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
5 trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
(sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162;
10 S55C:163-165; L142C:424-426; L188C:562-564; V296I:886-888;
N371C:1111-1113]

**SEQ ID NO:9: Secuencia de Nucleótidos que codifica
el Polipéptido Precursor de pXCS780:**

15 atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
gcttcgcatcgggacagaaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcggtgtc
caagggttacctctcggccctgagaactggctggtacacctgtgtgattactatcgagctg
agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgaccctgc
20 cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcattgaattacacctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggagggttctgggattcctgttg
gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtgcccggtgtccaaagtgctgcatctggaggggga

agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcggtggtgtccctgagcaac
 ggagtcagcgtgtgtacatccaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
 tgcccatcgtcaacaagcagtcattgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
 gcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgggaggtttccgtgaacgccggagtgacc
 5 actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
 cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgccaacagtc
 ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaagtgctcgcttatgtggtgcaattgcctctg
 tacggagtcattcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
 ccaaggaaggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctggtattgcgataatgc
 10 tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgagtcacaaaccgcgtgttc
 tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
 ttaaccgaaatacgaactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
 cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaatacactgcctcgaacaag
 aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtg
 15 acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
 cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccccctgggtgtcccttcctccgagttc
 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtccttgccttcattccggaagt
 cggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc
 ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
 20 cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):

Secuencia de señal: 1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-

327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
5 I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
(sustitución de origen natural): 1339-1341; S55C:163-165;
L188C:562-564; D486S:1456-1458]

SEQ ID NO:10: Secuencia de Nucleótidos que codifica

10 el Polipéptido Precursor de pXCS830:

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
gcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcggtgtc
caagggttacctctcggccctgagaactggctggtaccactgtgtgattactatcgagctg
agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaagggtcaagctgattaagcagg
15 aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgacccctgc
cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacacctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggagggttctgggattcctgttgg
gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtgccgtgtccaaagtgctgcatctggaggggga
agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcggtgggtgtccctgagcaac
20 ggagtcagcgtgtgtacaatcaagggtcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
tgcccatcgtcaacaagcagtcatgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
gcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgggaggttttccgtgaacgccggagtgacc

actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
 cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
 ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaagtgctcgcttatgtggtgcaattgcctctg
 tacggagtcacgcacacacctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
 5 ccaaggaagggtccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctggtattgcgataatgc
 tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtcaaaccgcgtgttc
 tgtgacaccatgaacagcctgacctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
 ttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
 cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaatacactgcctcgaacaag
 10 aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtg
 acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
 cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccccctgggtgttcccttccgacgagttc
 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtccttgccttcatccggaagt
 cggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatccggaagccccccagggatggacaggc
 15 ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
 cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):
 Secuencia de señal:1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
 327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
 20 trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
 1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
 1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;

I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
 (sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162;
 S55C:163-165; L188C:562-564; S190I:568-570]

5 **SEQ ID NO:11: Secuencia de Nucleótidos que codifica
 el Polipéptido Precursor de pXCS847:**

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
 gcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcggtgtc
 caagggttacctctcggccctgagaactggctggtacaccagcgtgattactatcgagctg
 10 agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
 aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgacccctgc
 ctgtaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacacctcaacaacgcg
 aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggaggttcttgggattcctgttgg
 gcgtgggctccgcatgtgcatccggagtgccgtgtccaaagtgctgcatctggaggggga
 15 agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcgggtggtgtccctgagcaac
 ggagtcagcgtgctgacaatcaaggtcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
 tgcccatcgtcaacaagcagtcattgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
 gcagaagaacaacagactgctcgaaattaccgggaggttttccgtgaacgccggagtgacc
 actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
 20 cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
 ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaagtgctcgccctatgtgggtgcaattgcctctg
 tacggagtcatcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca

ccaaggaaggtccaacatctgcctgactaggaaccgatcggggctgggtattgcgataatgc
tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtcaaaccgcgtgttc
tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
ttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
5 cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaatagcactgcctcgaacaag
aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtg
acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccctgggtgttccttccctccgagttc
gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtccttgccttcacccggaagt
10 cggacgaactgctgtccgccatcggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc
ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgcc
cgcggctcacaccatcatcaccaccacggttcgtggtccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):

Secuencia de señal:1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
15 327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
20 (sustitución de origen natural): 1339-1341; T103C:307-309;
I148C:442-444; S190I:568-570; D486S:1456-1458]

**SEQ ID NO:12: Secuencia de Nucleótidos que codifica
el Polipéptido Precursor de pXCS851:**

```

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
gcttcgcatcgggacagaaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcggtgtc
5 caagggttacctctcggccctgagaactggctggtaccacagcgtgattactatcgagctg
agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgacccctgc
ctgtaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacacctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcgagggttctgggattcctgttgg
10 gcgtgggctccgcatgtgcatccggagtgccgtgtccaaagtgctgcatctggaggggga
agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcggtggtgtccctgagcaac
ggagtcagcgtgctgacaatcaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
tgcccatcgtcaacaagcagtcatgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
gcagaagaacaacagactgctcgaaattaccgggaggttttccgtgaacgccggagtgacc
15 actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaaatcctcgccctatgtgggtgcaattgcctctg
tacggagtcatcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
ccaaggaaggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctgggtattgcgataatgc
20 tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtc aaaccgcgtgttc
tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
ttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat

```

cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaagaccaaatgcactgcctcgaacaag
 aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaagggagtgg
 acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggagggggaagtcgctcta
 cgtcaagggggaaccgattatcaattttctacgacccctgggtgttcccttcctccgagttc
 5 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtctcttgccttcacccggaagt
 cggacgaactgctgtccgcatcggtggctatatccggaagccccagggatggacagggc
 ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
 cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtgggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):

10 Secuencia de señal:1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
 327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
 trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
 1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
 1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
 15 I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
 (sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162;
 T103C: 307-309; I148C:442-444; S190I:568-570; V296I:886-888;
 D486S:1456-1458]

20 **SEQ ID NO:13: Secuencia de Nucleótidos que codifica
 el Polipéptido Precursor de pXCS852:**

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct

gcttcgcatcgggacagaaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcgggtgtc
caaggggttacctctcggccctgagaactggctggtaccactgtgtgattactatcgagctg
agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgaccctgc
5 cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacacctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggagggttctgggattcctgttgg
gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtgcccggtgtccaaagtgtgcatctggaggggga
agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcgggtgggtgtccctgagcaac
ggagtcagcgtgtgtacatccaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
10 tgcccatcgtcaacaagcagtcattgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
gcagaagaacaacagactgctcgaaattaccgggaggttttccgtgaacgccggagtgacc
actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaagtgtcgcctatgtgggtgcaattgcctctg
15 tacggagtcatcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
ccaaggaaggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctggtattgcgataatgc
tgggtccgtgagcttcttcccgcaagccgagacttgcaaagtgcagtcaaaccgcgtgttc
tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
ttaaccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
20 cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaatagcactgcctcgaacaag
aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtg
acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta

cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccctggtggtcccttcctccgagttc
 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagttctcttgcccttcacccggaagt
 cggacgaactgctgtccgccatcggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc
 ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
 5 cgcggctcacaccatcatcaccaccacggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):
 Secuencia de señal: 1-75; pep27: 328-408; F1:409-1539
 (únicamente incluye la secuencia F de RSV nativa); F2:76-327;
 plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de trombina:
 10 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II: 1681-1704;
 Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638, 1675-1680;
 P102A (sustitución de origen natural): 304-306; I379V
 (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
 (sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162;
 15 S55C:163-165; L188C:562-564; D486S:1456-1458]

**SEQ ID NO:14: Secuencia de Nucleótidos que codifica
 el Polipéptido Precursor de pXCS853:**

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
 20 gcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagttccacctgttcggcggtgtc
 caagggttacctctcggccctgagaactggctggtacacctgtgtgattactatcgagctg
 agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg

aactcgataagttacaagaacgcccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgacccctgc
cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacaccctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggagggttctgggattcctgttgg
gcggtgggctccgcaatcgcatccggagtgccggtgtccaaagtgctgcatctggaggggga
5 agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcgggtggtgtccctgagcaac
ggagtcagcgtgtgtacaatcaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
tgcccatcgtcaacaagcagtcatgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
gcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgggaggttttccgtgaacgccggagtgacc
actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
10 cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcccacagtc
ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaagtgtcgcctatgtggtgcaattgcctctg
tacggagtcatcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
ccaaggaagggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctggtattgcgataatgc
tggggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtcaaaccgcgtgttc
15 tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
ttaaccgaaatacgaactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaatacactgcctcgaacaag
aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtg
acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
20 cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccctgggtgttcccttcctccgagttc
gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtcctcttgccctcatccggaagt
cggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc

ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Componentes relevantes (coordinados de bp):

Secuencia de señal: 1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
5 327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
10 (sustitución de origen natural): 1339-1341; S55C:163-165;
L188C:562-564; S190I:568-570; D486S:1456-1458]

**SEQ ID NO:15: Secuencia de Nucleótidos que codifica
el Polipéptido Precursor de pXCS855:**

15 atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
gcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagttccacctgttcggcggtgtc
caagggttacctctcggccctgagaactggctggtaccactgtgtgattactatcgagctg
agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgaccctgc
20 cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacacctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcgagggttctgggattcctgttgg
gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtgcccggtgtccaaagtgctgcatctggaggggga

agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcggtggtgtccctgagcaac
 ggagtcagcgtgtgtacaatcaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
 tgcccatcgtcaacaagcagtcattgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
 gcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgggaggtttccgtgaacgccggagtgacc
 5 actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
 cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgccaacagtc
 ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaagtgctcgcttatgtggtgcaattgcctctg
 tacggagtcacgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
 ccaaggaaggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctggtattgcgataatgc
 10 tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgagtcacaaaccgcgtgttc
 tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
 ttaaccgaaatacgaactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
 cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaatacactgcctcgaacaag
 aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggagtggtg
 15 acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
 cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccctggtgttcccttcctccgagttc
 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtccttgccttcacccggaagt
 cggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc
 ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
 20 cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Características relevantes (coordinados de bp):

Secuencia de señal: 1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-

327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II: 1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638, 1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
 5 I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V (sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162; S55C:163-165; L188C:562-564; S190I:568-570; D486S:1456-1458]

**SEQ ID NO:16: Secuencia de Nucleótidos que codifica
 10 el Polipéptido Precursor de pXCS874:**

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgcc
 gtcaccttctgcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagtccacctgtt
 cggcgggtgtccaagggttacctctcggccctgagaactggctggtacaccagcgtgattac
 tatcgagctgagcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaagggtcaagctg
 15 attaagcaggaactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaat
 cgacccctgccactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacaccct
 caacaacgcgaagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggaggttcttgga
 ttctctgttgggcgtgggctccgcaatcgcatccggagtggccgtgtgtaaagtgctgcac
 tggaggggggaagtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcgggtggtgtc
 20 cctgagcaacggagtcagcgtgctgacaatcaaggctcctggacctcaagaactacatcgac
 aagcagctgttgcccatcgtcaacaagcagtcatgctcgattagcaatatcgaaaccgtga
 ttgagttccagcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgggagttttccgtgaacgc

cggagtgaccactcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatc
 aacgatatgccgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgc
 gccaacagtcctactcaatcatgtgcattatcaaggaggaagtgctcgcctatgtgggtgca
 attgcctctgtacggagtcacgcacacacctgctggaagctgcacactagcccactctgt
 5 acgaccaacaccaaggaaggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctgggtatt
 gcgataatgctgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtcaaa
 ccgctgttctgtgacaccatgaacagcctgacctgccatccgaagtcaacctctgcaac
 gtggacatctttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagca
 gctctgtcatcactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaaagtgcactgc
 10 ctgacaagaacagaggcatcatcaagaccttcagcaacgggtgtgactacgtgtccaac
 aaggagtggtgacaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggagggga
 agtcgctctacgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccccctgggtgttcccttc
 ctccgagttcgatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtccttgccttc
 atccggaagtcggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatccggaagccccccaggg
 15 atggacaggcctacgtgcggaaggatgggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggagg
 tctgggtgccccgcggctcacaccatcatcaccaccacgggttcgtgggtcccaccctcaattt
 gagaagtga

[Características relevantes (coordinados de bp):
 Secuencia de señal: 1-75; pep27:328-408; F1: 409-1539; F2:76-
 20 327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
 trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
 1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,

1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
 I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
 (sustitución de origen natural): 1339-1341; S155C:463-465;
 S190I:568-570; S290C:868-870; D486S:1456-1458]

5

**SEQ ID NO:17: Secuencia de Nucleótidos que codifica
 el Polipéptido Precursor de pXCS881:**

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
 gcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcgggtgtc
 10 caagggttacctctcggccctgagaactggctggtaccactgtgtgattactatcgagctg
 agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
 aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgacccctgc
 cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacaccctcaacaacgcg
 aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcggagggttcctgggattcctgtgtg
 15 gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtggccgtgtccaaagtgctgcatctggaggggga
 agtgaacaagatcaagtccgccctcctgtcaactaataaggcgggtggtgtccctgagcaac
 ggagtcagcgtgtgtacatccaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
 tgcccatcgtcaacaagcagtcatgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
 gcagaagaacaacagactgctcgaaattacccgaggagttttccgtgaacgccggagtgacc
 20 actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
 cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
 ctactcaatcatgtcaattatcaaggaggaaatcctcgcttatgtgggtgcaattgcctctg

tacggagtcacgcacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
ccaaggaagggtccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctgggtattgcgataatgc
tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtc aaaccgcgtgttc
tgtgacaccatgtgtagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
5 ttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaa atgcactgcctcgaacaag
aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaagggagtg
acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggaggggaagtcgctcta
cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccctgggtgttccttccagccagttc
10 agtgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtctcttgccttcatccggaagt
cggacgaactgctgtccgcatcggtggctatatccggaagccccagggatggacaggc
ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtgggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Características relevantes (coordinados de bp):

15 Secuencia de señal: 1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
327; plegado:1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
20 I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
(sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162;
S55C: 163-165; L142C:424-426; L188C:562-564; V296I:886-888;

N371C:1111-1113; D486S:1456-1458; E487Q:1459-1461;
D489S:1465-1467]

SEQ ID NO:18: Secuencia de Nucleótidos que codifica

5 el Polipéptido Precursor de pXCS898:

atggaacttctgatcctgaaagccaacgcgattaccactatcctgactgccgtcaccttct
gcttcgcatcgggacagaacattaccgaggagttctaccagtccacctgttcggcggtgtc
caagggttacctctcggccctgagaactggctggtaccacagcgtgattactatcgagctg
agcaacatcaaggagaacaagtgcaatggaacggacgcgaaggtcaagctgattaagcagg
10 aactcgataagtacaagaacgccgtgaccgagctccagctgctgatgcaatcgaccctgc
cactaacaacagagctcgccgggaactgccgcgcttcatgaattacacctcaacaacgcg
aagaaaaccaacgtgaccctgtccaagaagcgcaagcgagggttcttgggattcctgttgg
gcgtgggctccgcaatcgcatccggagtgcccggtgtgtaaagtgctgcatctggaggggga
agtgaacaagatcaagtcgccctcctgtcaactaataaggcggtgggtgtccctgagcaac
15 ggagtcagcgtgctgacaatcaaggctcctggacctcaagaactacatcgacaagcagctgt
tgcccatcgtcaacaagcagtcattgctcgattagcaatatcgaaaccgtgattgagttcca
gcagaagaacaacagactgctcgaaattaccgggagttttccgtgaacgccggagtgacc
actcctgtgtccacctacatgcttacgaactccgaactgctcagcctcatcaacgatatgc
cgatcactaacgaccagaagaagttgatgagcaacaatgtgcagatcgtgcgccaacagtc
20 ctactcaatcatgtgcattatcaaggaggaaatcctcgcttatgtgggtgcaattgcctctg
tacggagtcatcgacacaccctgctggaagctgcacactagcccactctgtacgaccaaca
ccaaggaaggttccaacatctgcctgactaggaccgatcggggctgggtattgcgataatgc

tgggtccgtgagcttcttcccgaagccgagacttgcaaagtgcagtc aaaccgcgtgttc
 tgtgacaccatgaacagcctgaccctgccatccgaagtcaacctctgcaacgtggacatct
 ttaacccgaaatacgactgcaagattatgacctccaagaccgacgtcagcagctctgtcat
 cactagcctgggagctattgtgtcctgctacggaaagaccaa atgcaactgcctcgaacaag
 5 aacagaggcatcatcaagaccttcagcaacggctgtgactacgtgtccaacaaggaggatgg
 acaccgtgtccgtcgggaacaccctgtactacgtgaacaagcaggagggggaagtcgctcta
 cgtcaagggggaaccgattatcaatttctacgacccccctgggtgttcccttccgacgagttc
 gatgcctccatatcccaagtcaacgagaagatcaaccagtcctcttgccttcatccggaagt
 cggacgaactgctgtccgccatcgggtggctatatattccggaagccccccagggatggacaggc
 10 ctacgtgcggaaggatggagaatgggtgcttttgtccaccttcctgggcggtctggtgccc
 cgcggtcacaccatcatcaccaccacgggttcgtggtcccaccctcaatttgagaagtga

[Características relevantes (coordinados de bp):
 Secuencia de señal:1-75; pep27:328-408; F1:409-1539; F2:76-
 327; plegado: 1552-1632; Secuencia de reconocimiento de
 15 trombina: 1639-1656; Etiqueta de His: 1657-1674; Streptag II:
 1681-1704; Secuencias de enlazador: 1540-1551, 1633-1638,
 1675-1680; P102A (sustitución de origen natural): 304-306;
 I379V (sustitución de origen natural): 1135-1137; M447V
 (sustitución de origen natural): 1339-1341; T54H:160-162;
 20 S155C: 463-465; S190I:568-570; S290C:868-870; V296I:886-888]

SEQ ID NO:19: Secuencia de Aminoácidos del Polipéptido Precursor de pXCS847:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPACNNRARRELPRFMNYTLNNA
 5 KKTNVTLSKKRKRFLGFLLGVSACASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLN
 GVSVLTIKVLDLKNIYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 10 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 15 el producto final): 1-25; pep27 (no presente en el producto
 final): 110-136; F1:137-513; F2:26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; P102A (sustitución de
 origen natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 20 (sustitución de origen natural); T103C; I148C; S190I; D486S]

SEQ ID NO:20: Secuencia de Aminoácidos del Polipéptido Precursor de pXCS851:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHSVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPACNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSSKKRRRFLGFLLGVSACASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTIKVLDLKNIYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVT
 5 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEILAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 10 RGSHHHHHHGSWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): Secuencia de señal (no presente en
 el producto final): 1-25; pep27 (no presente en el producto
 final): 110-136; F1:137-513; F2:26-109; plegado: 518-544;
 15 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; P102A (sustitución de
 origen natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 (sustitución de origen natural); T54H; T103C; I148C; S190I;
 V296I; D486S]

20

**SEQ ID NO:21: Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS852:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSSKKRRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVT
 5 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 10 RGSHHHHHHGSWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final):1-25; pep27 (no presente en el producto
 final):110-136; F1:137-513 (únicamente incluye la secuencia F
 15 de RSV nativa); F2:26-109; plegado: 518-544; Secuencia de
 reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de His:553-558;
 Streptag II:561-568; P102A (sustitución de origen natural);
 I379V (sustitución de origen natural); M447V (sustitución de
 origen natural); T54H (mutación introducida); S55C (mutación
 20 introducida); L188C (mutación introducida); D486S (mutación
 introducida)]

SEQ ID NO:22: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Pesada del Anticuerpo D25:**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNYIINWLRQAPGQGPEWMGGIIPVLGTVHYA
 PKFQGRVTITADESTDTAYIHLISLRSEDTAMYCATETALVVSTTYLPHYFDNWGQGTLV

5 TVSS

SEQ ID NO:23: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Ligera del Anticuerpo D25:**

DIQMTQSPSSLSAAVGDRVTITCQASQDIVNYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASNLETGVPSR

10 FSGSGSGTDFSLTISSSLQPEDVATYYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIKR

SEQ ID NO:24: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Pesada del Anticuerpo AM14:**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSHYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGENTYYA

15 DSVKGRFSISRDNKNTVSLQMNSLRPEDTALYYCARDRIVDDYYYYGMDVWGQGATVTVS

S

SEQ ID NO:25: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Ligera del Anticuerpo AM14:**

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIKKYLNWYHQKPGKVPPELLMHDASNLETGVPSR

FSGRSGSGTDFTLTISSSLQPEDIGTYTCQQYDNLPLPLTFGGGTKVEIKRTV

SEQ ID NO:26: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Pesada del Anticuerpo AM22**

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGGYEGEVDEIFYA
 QKFQHRLTVIADTATDTVYMELGRLTSDDTAVYFCGTLGVTVTTEAGLGIDDYWGQGTLVTV

5 SS

SEQ ID NO:27: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Ligera del Anticuerpo AM22**

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGASSRATGIPV

10 RFSGSGSGTDFTLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVDFK

SEQ ID NO:28: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Pesada del Anticuerpo MPE8:**

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISASSSYSDYA

15 DSAKGRFTISRDNKTSLEFLQMNSLRAEDTAIFYCARARATGYSSITPYFDIWGQGTLVTV

SS

SEQ ID NO:29: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Ligera del Anticuerpo MPE8:**

QSVVTQTPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNNRPSGVP

20 DRFSASKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDRNLSGVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO:30: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Pesada del Anticuerpo 101F:**

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY
 NPSLKSRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARLYGFTYGFAYWGQGLVTVSA

5

SEQ ID NO:31: Secuencia de Aminoácidos de Dominio**Variable de Cadena Ligera del Anticuerpo 101F:**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIFCRASQSVDYNGISYMHWFQQKPGQPPKLLIYAASNPESE
 IPARFTGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQIIEDPWTFGGGTKLEIK

10

SEQ ID NO: 32: Secuencia de Aminoácidos del**Polipéptido Precursor de pXCS738:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 15 KKTNVTLSKKRKRRLGFLCGVGSASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEILAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMCSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 20 NRGIIKTFSGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en el producto final): 1-25; pep27 (no presente en el producto final):110-136; F1:137; F2:26-109; plegado: 518-544;

5 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador: 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V (sustitución de origen natural); T54H (mutación introducida);

10 S55C (mutación introducida); L142C (mutación introducida); L188C (mutación introducida); V296I (mutación introducida); N371C (mutación introducida)]

SEQ ID NO:33: Secuencia de Aminoácidos del

15 **Polipéptido Precursor de pXCS780:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTCVITIEL
 SNIKENKCGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSSKKRRRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVT
 20 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK

NRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 5 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final): 1-25; pep27 (no presente en el producto
 final):110-136; F1:137-513; F2:26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:
 10 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen
 natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 (sustitución de origen natural); S55C (mutación introducida);
 L188C (mutación introducida); D486S (mutación introducida)]

15 **SEQ ID NO:34: Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS830:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSSKKRKRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN
 20 GVSVCTIKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYADNCGSVSFFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHGSWSHPQFEK

5 [Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final): 1-25; pep27 (no presente en el producto
 final):110-136; F1:137-513; F2:26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 10 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:
 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen
 natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 (sustitución de origen natural); T54H (mutación introducida);
 S55C (mutación introducida); L188C (mutación introducida);
 15 S190I (mutación introducida)]

**SEQ ID NO:35: Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS853:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTCVITIEL
 20 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSKKRKRRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTIKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVT

TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSSEF
 5 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGSWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final):1-25; pep27 (no presente en el producto
 10 final): 110-136; F1:137-513; F2:26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:
 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen
 natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 15 (sustitución de origen natural); S55C (mutación introducida);
 L188C (mutación introducida); S190I (mutación introducida);
 D486S (mutación introducida)]

SEQ ID NO:36: Secuencia de Aminoácidos del
 20 **Polipéptido Precursor de pXCS855:**
 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA

KKTNVTL SKKRKR RFLG FLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTIKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTD RGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 5 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 10 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final): 1-25; pep27 (no presente en el producto
 final): 110-136; F1: 137-513; F2: 26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:
 15 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen
 natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 (sustitución de origen natural); T54H (mutación introducida);
 S55C (mutación introducida); L188C (mutación introducida);
 S190I (mutación introducida); D486S (mutación introducida)]

20

**SEQ ID NO: 37: Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS874:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSSKKRRRFLGFLLGVGSAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVLTIKVLDLKNIYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 5 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 10 RGSHHHHHHGWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final):1-25; pep27 (no presente en el producto
 final):110-136; F1: 137-513; F2: 26-109; plegado: 518-544;
 15 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:
 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen
 natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 (sustitución de origen natural); S155C (mutación introducida);
 20 S190I (mutación introducida); S290C (mutación introducida);
 D486S (mutación introducida)]

SEQ ID NO:38: Secuencia de Aminoácidos del Polipéptido Precursor de pXCS881:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 5 KKTNVTL SKKRKR RFLGFLCGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKS ALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEILAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTD RGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMCSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 10 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSQF
 SASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHHGSWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 15 el producto final):1-25; pep27 (no presente en el producto
 final):110-136; F1: 137-513; F2: 26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:
 514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen
 20 natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V
 (sustitución de origen natural); T54H (mutación introducida);
 S55C (mutación introducida); L142C (mutación introducida);

L188C (mutación introducida); V296I (mutación introducida);
 N371C (mutación introducida); D486S (mutación introducida);
 E487Q (mutación introducida); D489S (mutación introducida)]

5 **SEQ ID NO:39: Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS898:**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHSVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 KKTNVTLSSKKRKRFLGFLLGVSASIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN
 10 GVSVLTIKVLDLKNIYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCIIKEEILAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEF
 15 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGLVP
 RGSHHHHHGSWSHPQFEK

[Características relevantes (coordinados de
 residuos de aminoácidos): secuencia de señal (no presente en
 el producto final):1-25; pep27 (no presente en el producto
 20 final): 110-136; F1:137-513; F2:26-109; plegado: 518-544;
 Secuencia de reconocimiento de trombina: 547-552; Etiqueta de
 His: 553-558; Streptag II: 561-568; Secuencias de enlazador:

514-517, 545-546, 559-560; P102A (sustitución de origen natural); I379V (sustitución de origen natural); M447V (sustitución de origen natural); T54H (mutación introducida); S155C (mutación introducida); S190I (mutación introducida);
 5 S290C (mutación introducida); V296I (mutación introducida)]

SEQ ID NO:40: Secuencia de Aminoácidos de Fibrina

T4 Plegada:

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

10

SEQ ID NO: 271. Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS899

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNA
 15 KKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLSN
 GVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPIV NKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVT
 TPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPL
 YGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTD RGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 20 NRGIIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP SSEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLGGLVPRGSHHHHHHGSWSHPQFEK

**SEQ ID NO: 272. Secuencia de Aminoácidos del
Polipéptido Precursor de pXCS1106**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTG
WYHCVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATGSAIASGVA
5 VSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSI
SNIETVIEFQQKNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMS
NNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTR
TDRGWYADNCGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMT
SKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVS NKGVDTVSVGNTLYY
10 VNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRCCDELLHNVNAG
KSTTNIMITTLVPRGSGGSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGHHHHHHGWS
HPQFEK

**SEQ ID NO: 273. Secuencia de Aminoácidos del
15 Polipéptido Precursor de pXCS1107**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATGSAIASGVA VSKVLHLEGE
V NKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQ
QKNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS
20 YSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYADNC
GSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVS NKGVDTVSVGNTLYY VNKQEGKSLY

VKGEP I I N F Y D P L V F P S S E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R K S D E L L H C C N A G K S T T N I M I T T
 L V P R G S G G S A I G G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L G G H H H H H G S W S H P Q F E K

SEQ ID NO: 274. Secuencia de Aminoácidos del

5 Polipéptido Precursor de pXCS1108

M E L L I L K A N A I T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y H C V I T I E L
 S N I K E N K C N G T D A K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T G S A I A S G V A V S K V L H L E G E
 V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V C T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I S N I E T V I E F Q
 Q K N N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V Q I V R Q Q S
 10 Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y A D N C
 G S V S F F P Q A E T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V N L C N V D I F N P K Y D C K I M T S K T D V S S S V I
 T S L G A I V S C Y G K T K C T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y
 V K G E P I I N F Y D P L V F P S S E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R K S D E L L H N V N A G K S C C N I M I T T
 L V P R G S G G S A I G G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L G G H H H H H G S W S H P Q F E K

15

SEQ ID NO: 275. Secuencia de Aminoácidos del

Polipéptido Precursor de pXCS1109

M E L L I L K A N A I T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y H C V I T I E L
 S N I K E N K C N G T D A K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T G S A I A S G V A V S K V L H L E G E
 20 V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V C T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I S N I E T V I E F Q
 Q K N N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V Q I V R Q Q S
 Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y A D N C

GSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
 TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLY
 VKGEPIINFYDPLVFPSSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRCCDELLHCCNAGKSTTNIMITT
 LVPRGSGGSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGHHHHHHGWSWHPQFEK

5

**SEQ ID NO: 276. Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS1110**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATGSAIASGVAVSKVLHLEGE
 10 VNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQ
 QKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS
 YSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYADNC
 GSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
 TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLY
 15 VKGEPIINFYDPLVFPSSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRCCDELLHNVNAGKSCCNIMITT
 LVPRGSGGSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGHHHHHHGWSWHPQFEK

**SEQ ID NO: 277. Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS1111**

20 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATGSAIASGVAVSKVLHLEGE
 VNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQ

QKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS
 YSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYADNC
 GSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
 TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLY
 5 VKGEPIINFYDPLVFPSSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHCCNAGKSCCNIMITT
 LVPRGSGGSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGHHHHHHGWSWHPQFEK

**SEQ ID NO: 278. Secuencia de Aminoácidos del
 Polipéptido Precursor de pXCS1112**

10 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYHCVITIEL
 SNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATGSAIASGVAVSKVLHLEGE
 VNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVCTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQ
 QKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQS
 YSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYADNC
 15 GSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
 TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLY
 VKGEPIINFYDPLVFPSSSEFDASISQVNEKINQSLAFIRCCDELLHCCNAGKSCCNIMITT
 LVPRGSGGSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGHHHHHHGWSWHPQFEK